

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Tereza Rydzyková

Vliv morfinu na neurogenezi a neurodegeneraci v mozku potkana
The effect of morphine on neurogenesis and neurodegeneration in
rat brain

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně s použitím uvedené literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 14.8.2017

Tereza Rydzyková

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za odborné vedení, vstřícný přístup a rady při vypracování mé diplomové práce. Dále pak děkuji paní doc. RNDr. Zdeně Bendové, Ph.D. za její pomoc a vstřícnost při konzultacích. Za praktickou pomoc při zavádění imunohistochemických technik děkuji Mgr. Simoně Moravcové.

Abstrakt

Morfin je klinicky používaným analgetikem ale zároveň také zneužívanou drogou. Působí v celé řadě oblastí CNS (nucleus accumbens, ventrální tegmentum, hipokampus, aj.) a ovlivňuje jejich funkce; například kognitivní funkce či anxieta. Ačkoliv výsledky dosud publikovaných studií jsou často protichůdné, byl prokázán i vliv na vznik a zánik buněk v CNS. V této práci jsme se zaměřili na to, jakým způsobem chronické podávání a následné vysazení morfinu ovlivňuje neurogenezi a neurodegeneraci v mozku potkana a zároveň jakým způsobem ovlivňuje některé markery zahrnuté do procesu vzniku závislosti a také stavu po vysazení drogy. Podařilo se nám úspěšně zavést imunohistochemické markery pro monitorování neurogeneze (bromodeoxyuridin, doublecortin), neurodegeneraci (Fluoro-Jade C) a detekci vybraných neuromodulačních peptidů (cholecystokinin, neuropeptid Y). Zjistili jsme, že morfin může ovlivňovat procesy neurogeneze a neurodegenerace, nicméně jeho vliv se liší v různých strukturách CNS (nucleus accumbens, hipokampus, amygdala).

Klíčová slova: Morfin, mozek, potkan, abstineční syndrom, neurogeneze, neurodegenerace

Abstract

Morfin is a clinically used analgesic drug but also an abusive drug. It has an impact on a wide range of CNS regions (nucleus accumbens, ventral tegmentum, hippocampus, etc.) and affects their functions, e.g. cognitive functions or anxiety. Although the results of so far published studies are often contradictory, the effects on cell death and proliferation in the CNS have been demonstrated. In this work, we focused on how chronic administration of morphine and subsequent withdrawal of this drug affects neurogenesis and neurodegeneration in the rat brain and how it affects some markers involved in the addiction and post-drug-induced condition. We have succeeded in introducing immunohistochemical markers for monitoring neurogenesis (bromodeoxyuridine and doublecortin) and neurodegeneration (Fluoro-Jade C) and for detection of selected neuromodulatory peptides (cholecystokinin and neuropeptide Y). We have found that morphine may influence the process of neurogenesis and neurodegeneration, but its effects differ in different CNS structures (nucleus accumbens, hippocampus, and amygdala).

Key words: Morphine, brain, rat, withdrawal syndrom, neurogenesis, neurodegeneration

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
Úvod	10
1. Literární přehled	11
1.1. Farmakologie a neurochemie působení morfinu	11
1.1.1. Struktura a vlastnosti morfinu	11
1.1.2. Klinické a experimentální využití morfinu	11
1.1.3. Drogová závislost	13
1.1.3.1. Morfin a závislost	14
1.1.4. Molekulární mechanismus působení morfinu	15
1.1.5. Vliv morfinu na CNS	16
1.2. Neuroplastické změny	18
1.2.1. Neurogeneze	18
1.2.2. Neurogeneze po podání morfinu	19
1.2.3. Vliv vysazení morfinu na neurogenezi	23
1.3. Neurodegenerace	24
1.3.1. Degenerace po podání morfinu	25
1.4. Vliv morfinu na vybrané neuromodulatorové systémy	29
1.4.1. Cholecystokinin	29
2. Cíle práce	31
3. Metodika	32
3.1. Chemikálie	32
3.2. Roztoky	32
3.3. Zvířata	32
3.4. Experimentální design	32
3.4.1. Roztoky	33
3.5. Odběr tkáně a příprava volně plovoucích řezů	33
3.6. Imunohistochemie	33
3.6.1. Roztoky	33
3.6.2. Další chemikálie	34
3.6.3. Postup práce	34
3.7. Imunofluorescence	35
3.7.1. Roztoky	35
3.7.2. Další chemikálie	35
3.7.3. Postup práce	35

3.8.	Barvení Fluoro-Jade C.....	35
3.8.1.	Roztoky	35
3.8.2.	Postup práce.....	35
3.9.	Analýza dat	36
3.10.	Statistické vyhodnocení výsledků.....	36
4.	Výsledky.....	37
4.1.	Cholecystokinin	37
4.2.	Neuropeptid Y	40
4.3.	Bromodeoxyuridin.....	44
4.4.	Doublecortin.....	46
4.5.	Fluoro-Jade C.....	49
5.	Diskuze.....	54
	Závěr	59
	Literatura.....	60

Seznam použitých zkratk

1°	primární
2°	sekundární
AC	adenylylcykláza
BrdU	bromo-deoxyuridin
BSA	albumin z bovinního séra
CA	centrální amygdala
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CAT	kataláza
CCK	cholecystokinin
CNS	centrální nervový systém
DAB	diaminobenzidin
DCX	doublecortin
DG	gyrus dentatus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPX	montovací médium pro histologii
FJC	Fluoro-Jade C
GABA	γ -amino-máselná kyselina
GSH	glutathion
GSHPx	glutathion peroxidáza
HEB	hematoencefalická bariéra
HCl	kyselina chlorovodíková
i.p.	intraperitoneálně
i.t.	intratekálně
LA	laterální amygdala
LV	laterální komory
MOR	μ -opioidní receptor
NAc	nucleus accumbens
NeuN	neuronal nuclei
NpY	neuropeptid Y

NS	nervová soustava
NSC	neuronální kmenové buňky
PBS	fosfátový pufr
PFA	paraformaldehyd
PFC	prefrontální kortex
PNS	periferní nervová soustava
ROS	volné kyslíkové radikály
s.c.	subkutánně
SGZ	subgranulární zóna
SOD	superoxid dismutáza
SVZ	subventrikulární zóna
SGL	subgranulární zóna
UDT	UDP-glukuronosyltransferáza
VTA	ventrální tegmentum

Úvod

Morfin je alkaloid, který je řazen do skupiny tzv. opiátů, tedy opioidů přírodního původu. Je to látka hojně využívaná v medicíně pro své silné analgetické a sedativní účinky k tišení především chronických bolestí, nezastupitelnou úlohu má zejména v paliativní medicíně. Mezi výhody používání morfinu můžeme zařadit jeho efektivitu, nízkou cenu, dobrou dostupnost, vhodné farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti. Morfin však vykazuje některé závažné vedlejší účinky, mezi něž patří útlum dechu, kardiovaskulární obtíže, obstipace či psychické problémy (Bounes et al., 2017). Jeho využití podléhá přísné kontrole zejména vzhledem k dalším zásadním nežádoucím účinkům, k nimž patří návykový potenciál morfinu, který je mezi farmaky jedním z největších, a rychlý rozvoj tolerance (Zadina et al., 2016). Opiáty jsou obecně jednou ze skupin nejčastěji zneužívaných návykových látek, prevalence se pohybuje kolem 0,4 % celosvětově, v Evropě pak dokonce 0,7 % (Cunha-oliveira et al., 2008). Jejich chronický abúzus se projevuje psychickými i somatickými patologiemi např. kognitivními deficity (Fishbein et al., 2007; Zhai et al., 2014) a glomerulopatii (Weber et al., 2009).

Studium účinků morfinu je zaměřeno jak na mechanismy analgetického působení, tak na mechanismus vzniku či udržování závislosti a na patofyziologické změny tímto stavem způsobené. Při popisování patofyziologie závislosti se výzkum soustředí především na oblast okruhu odměny a na oblasti CNS funkčně s tímto okruhem propojené a zároveň spoluzodpovědné za vznik závislosti jako je hipokampus, amygdala a prefrontální kortex (Recinto et al., 2011). Některými z významných alterací, které morfin v těchto oblastech způsobuje, je narušování funkce a přežívání jednotlivých buněk či rozvoj úzkostného chování (Wen et al., 2014). Chronické působení tohoto farmaka ovlivňuje vznik nových neuronů a zároveň i jejich maturaci, čímž může narušovat kognitivní funkce, např. učení a paměť (Zheng et al., 2013). Na druhou stranu morfin narušuje funkci jak nezralých, tak již zralých buněk vyvoláním oxidativního stresu, který může způsobit až zánik dané buňky (Motaghinejad et al., 2015). Oba tyto aspekty chronického působení morfinu vedou k řadě behaviorálních a kognitivních změn, které lze pozorovat jako syndrom závislosti u pacientů a zároveň i u experimentálních zvířat.

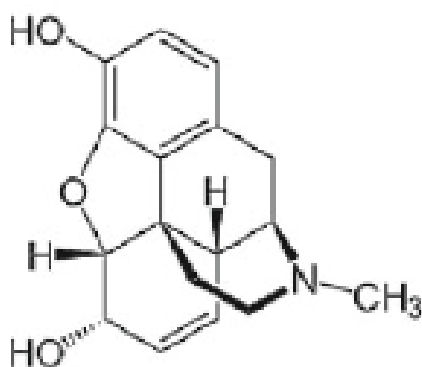
V této práci se budu zabývat působením chronického podávání morfinu a jeho následného vysazení především na procesy neurogeneze a neurodegenerace v mozku potkana. Dosavadní studie ukazují na vliv morfinu na tyto děje, nicméně výsledky těchto studií se často liší, některé výzkumy přinesly i protichůdné výsledky. Budeme proto zjišťovat, jakým způsobem budou tyto procesy ovlivněny naším dávkovacím schématem a způsobem administrace. Dále jsme vybrali některé markery (neuropeptid Y, cholecystokinin), které s danými procesy mohou souviset a na které má morfin prokazatelně vliv (Wen et al., 2012).

1. Literární přehled

1.1. Farmakologie a neurochemie působení morfinu

1.1.1. Struktura a vlastnosti morfinu

Morfin je přírodní alkaloid odvozený od fenantrenu přirozeně obsažený v rostlině mák setý (*Papaverum somniferum*), jehož chemický funkční vzorec je (5 α , 6 α) 7,8 didehydro-4,5 epoxy 17 methylmorfinan 3,6 diol. Strukturní vzorec molekuly morfinu je uveden na obr. 1. Jedná se o bílou krystalickou látku vyráběnou izolací ze surového opia.



Obr. 1 **Strukturní vzorec morfinu**. Upraveno podle (De Gregori et al., 2012).

Biodostupnost morfinu je po orálním podání relativně nízká (20-30%) vzhledem k předchozímu průchodu játry (first-pass efekt) (Sverrisdóttir et al., 2015). Hlavní metabolickou změnou morfinu, ke které v těle dochází, je glukuronizace pomocí enzymu UDP-glukuronosyltransferázy (UDT) (De Gregori et al., 2012). Vznikají dva metabolity - morfin-3-glukuronid a morfin-6-glukuronid, z nichž pouze morfin-6-glukuronid prochází hematoencefalickou bariérou (HEB) (De Gregori et al., 2012). Analgetické působení je tedy zprostředkované pouze tímto metabolitem morfinu. Ačkoliv tohoto metabolitu vzniká 5x méně a přes HEB prochází 7,5x hůře než morfin (De Gregori et al., 2012), je silným analgetikem, protože se na μ -opioidní receptory váže již v nízkých koncentracích (Sverrisdóttir et al., 2015).

1.1.2. Klinické a experimentální využití morfinu

Morfin patří k široce používaným farmakům, ale zároveň jej řadíme k vysoce návykovým drogám. Existuje proto rozsáhlý výzkum (často látek založených na struktuře morfinu) snažící se o vývoj farmak s méně návykovým potenciálem i menšími vedlejšími účinky (Zadina et al., 2016). Toto je zároveň hlavní cíl pro klinický výzkum, který se morfinem zabývá. Cílem experimentálních studií je pak často popsání mechanismů, jakými morfin v mozku vyvolává nežádoucí účinky, především závislost.

V klinické praxi je stále používání morfinu poměrně rozšířené. Morfin je často označován za „zlatý standard“ v léčbě jinak těžko tižitelných bolestí, a to především v paliativní péči. Používán je ale např. i k premedikacím před operacemi. Nicméně několik procent pacientů opiáty zneužívá a vypěstuje si na nich závislost; konkrétně u morfinu se jedná asi o 0,4% pacientů léčených touto skupinou farmak (Brownstein et al., 2010).

1.1.2.1. Účinky

Účinky morfinu můžeme rozdělit na centrální a periferní. Mezi centrální řadíme především jeho účinek analgetický, dále pak sedativní, anxiolytický a možné vyvolání euforie či naopak dysforie a psychomotorický neklid (Bounes et al., 2017). Významným nežádoucím účinkem je zejména útlum dechového centra (Zadina et al., 2016). Mezi periferní účinky se řadí např. obstipace či zvýšený tonus až křeče hladkého svalstva, nauzea, zvracení, svědění kůže a další (Minami et al., 1995; Bounes et al., 2017). Morfin má také účinky na tělesnou hmotnost; v experimentálních modelech váhu již při subchronickém podávání snižuje (Zan et al., 2015); podávání morfinu totiž snižuje příjem potravy (Houshyar et al., 2004). Účinek morfinu, který vedl k největším omezením v jeho používání, je jeho potenciál vyvolat závislost. Tato schopnost je podrobněji rozebrána v následující kapitole. Dalším významným omezením při použití této látky je fakt, že při podávání morfinu se rychle vyvíjí tolerance¹ vůči jeho analgetickým účinkům (Zadina et al., 2016; Xiong et al., 2006). Naopak ale může chronické podávání morfinu způsobit i senzitivizaci² vůči jeho působení (Wen et al., 2013).

1.1.2.2. Klinické a experimentální dávkování

Morfin lze v klinické praxi administrovat několika způsoby – orálně, intravenózně, intramuskulárně, subkutánně. Ve výzkumu se používá široká paleta různých způsobů podání: injekce intraperitoneální, případně intravenózní, intracerebrální aplikace kanylou nebo subkutánní umístění morfinových pelet. Dávkování morfinu je v klinické praxi značně individuální. Standardně se pro 70 kg osobu používají dávky od 5-60 mg a to v závislosti na způsobu podání (Sverrisdóttir et al., 2015). Experimentálně se podávané dávky značně liší často podle zkoumané problematiky, na kterou je zaměřena konkrétní studie (analgie, toxicita aj.). Obecně se používají dávky od jednotek až po desítky miligramů na kilogram hmotnosti zvířete, při stupňujícím se podávání dávek dosahuje poslední dávka nežídka i 100 mg/kg (Fischer et al., 2008). V rozmezí běžně používaných dávek u zvířat je morfin schopen vyvolat analgézii např. při aplikaci 5,6-10 mg/kg na 2-3 hodiny (Zadina et al., 2016).

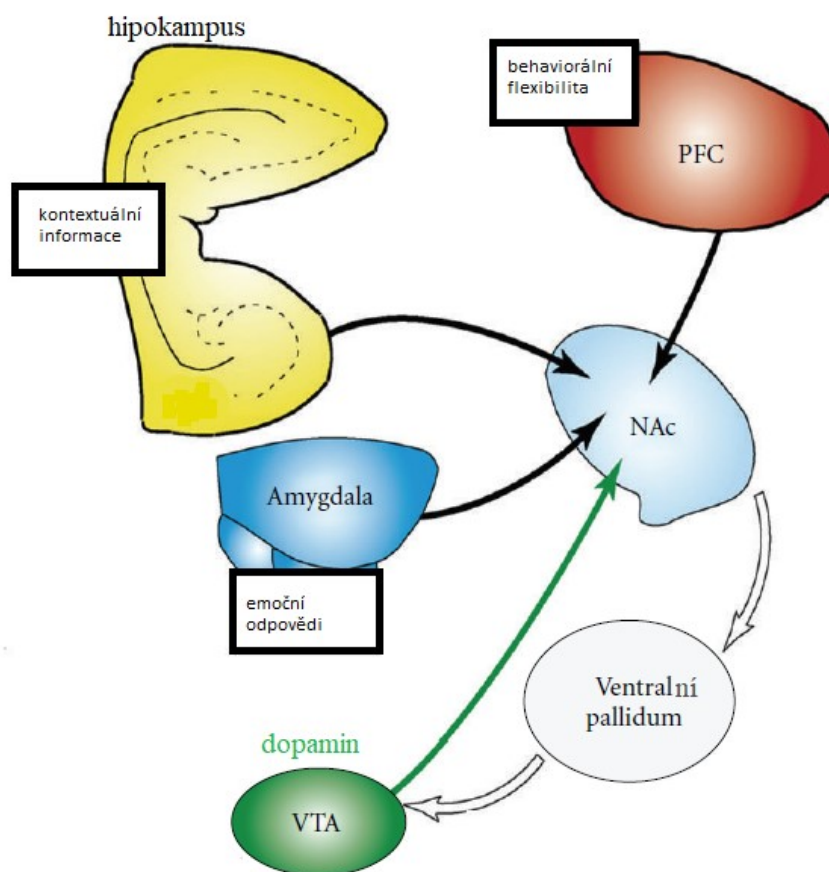
¹ Tolerance – stav, kdy jsou k dosažení stejného efektu (např. utlumení bolesti) při delší konzumaci/podávání látky/farmaka potřeba stále větší dávky.

² Senzitivizace – opak tolerance. Nižší dávka podané látky vyvolá větší odpověď organismu.

1.1.3. Drogová závislost

Závislost (toxikomanie, narkomanie) je složitý patofyziologický stav, který může být označen např. za „abnormální učení a paměť s impulzivním rozhodováním“ (Zhai et al., 2014). Jedná se o stav vyvolaný častým užíváním návykových látek, ve kterém se uplatňuje řada mozkových struktur. Hlavním okruhem zodpovědným za tvorbu závislostí je tzv. okruh odměny („reward circuit“), tedy systém podkorových struktur jako je ventrální tegmentum (VTA) či nuclues accumbens (NAc), které hrají výraznou roli v motivačním chování jedince (Cooper et al., 2017). VTA je důležité dopaminergní jádro projekující do řady korových i podkorových mozkových struktur, přičemž hlavní projekce je vedena do NAc (Cooper et al., 2017). NAc struktura, jejíž funkcí je ovlivňování motivačního chování na konkrétní stimul podle toho, zda vyvolá v jedinci pocit odměny či averzi (Cooper et al., 2017). Kromě samotného okruhu odměny ve vzniku a udržování závislostí uplatňují i další oblasti, které jsou funkčně i anatomicky spojeny s tímto okruhem (viz obr. č. 2). Jde o struktury jako je hipokampus (Esmaeili et al., 2012) amygdala či prefrontální kůra (Patel et al., 2013; Zhai et al., 2014; přehled viz Cooper et al., 2017).

Při přerušení aplikace návykové látky se objeví subjektivně nepříjemné somatické i psychické příznaky, které lze popsat jako abstinenční syndrom (syndrom z vysazení). Mezi dalšími se objevuje i tzv. *craving*, neboli bažení po droze, které uživatele drog kompulzivně nutí k opětovné aplikaci drogy. Syndrom z vysazení je podrobněji rozebrán konkrétněji v souvislosti s užíváním morfinu v následující podkapitole.



Obr. č. 2. **Vzájemné vztahy mozkových struktur účastnících se vzniku závislosti.** PFC – prefrontální kůra, NAc – nucleus accumbens, VTA – ventrální tegmentum. Upraveno dle (Isokawa, 2012).

Mechanismus, kterým návykové drogy působí na okruh odměny, je následující (Cunha-oliveira et al., 2008). Droga jako je morfin snižuje GABA-ergní (inhibiční) transmisim, a proto dojde k masivnímu výlevu dopaminu. Konkrétněji se morfin váže na mu-opioidní receptory (MOR), které jsou přítomné na těchto GABA-ergních interneuronech v oblasti ventrálního tegmenta. Fyziologickou funkcí těchto buněk je tlumit výlev dopaminu dopaminergními neurony v tomto okruhu. Podání morfinu vede k utlumení této inhibice a vyplavení velkého množství dopaminu z oblasti VTA a tedy k aktivaci okruhu odměny.

1.1.3.1. Morfin a závislost

Morfin je návykovou látkou, schopnou vyvolat psychickou i fyzickou závislost. Ta je na této látce velmi silná a závislost se rozvíjí velice rychle (Zadina et al., 2016). Závislost na morfinu, tzv. morfinismus, je pokládána za závažné onemocnění. U drogově závislých byla prokázána řada změn, např. alterace endogenního opioidního systému (Bazov et al., 2011), narušení motorických dovedností (Zadina et al., 2016), a také ovlivnění buněk imunitního systému (byla prokázána aktivace mikroglií po podání morfinu) (Zadina et al., 2016).

Při odeznění účinků morfinu (i dalších návykových látek) u závislých osob se následně projeví abstinenci příznaky, které zahrnují nevolnost, třes, pocení, afektivní změny a další (Naderi-Heiden et al., 2005). U zvířat dochází k výrazným behaviorálním projevům, jako jsou charakteristické pohyby hlavou, skákání, apod. (Goeldner et al., 2011). Dále dochází k poruchám paměti a sociálních interakcí (Goeldner et al., 2011), nástupu anxiety (Niu et al., 2017) až k rozvoji deprese (Zan et al., 2015). Tento vliv na afektivní chování je zřejmě způsobem vlivem vysazení morfinu na serotonergní systém (Goeldner et al., 2011). Na syndromu z vysazení se ale podílí i řada dalších neurotransmiterových systémů (Niu et al., 2017). Konkrétně lze jmenovat např. noradrenergí locus coeruleus (Dossin et al., 1996) či alterace opioidního systému – konkrétně zvýšená aktivace kappa-opioidního systému vlivem zvýšené exprese dynorfinu při abstinenci (Zan et al., 2015). Při chronickém podávání i malých dávek (i.p. 2,5-10 mg/kg. po 10 dní) byly prokázány rozsáhlé funkční změny řady mozkových systémů např. hipokampu, amygdaly, NAc, hypothalamu, cingulárního kortexu, striata a ventrálního tegmenta (Niu et al., 2017). Vysazení vyvolává i některé funkční změny, např. v synaptickém přenosu (Han et al., 2015).

1.1.4. Molekulární mechanismus působení morfinu

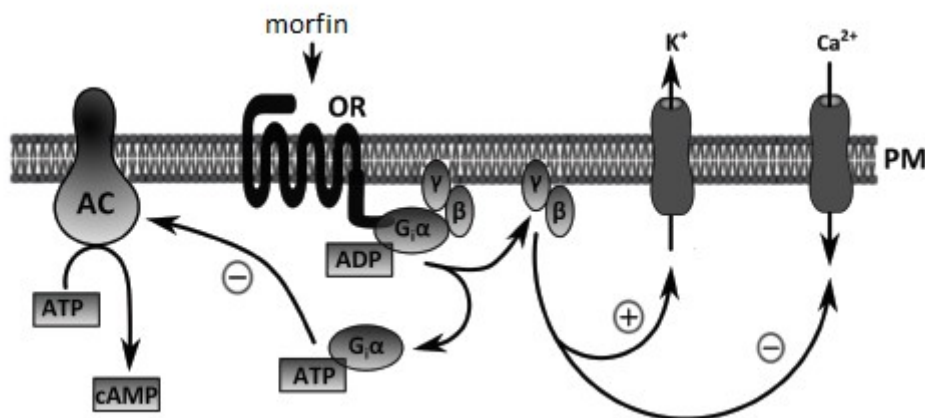
Morfin se váže na tři skupiny receptorů: μ (μ), delta (δ) a kappa (κ) (Zadina et al., 2016). Klinicky relevantní je především vazba na μ -opioidní receptory (MOR), vůči nimž vykazuje morfin nejvyšší afinitu (viz tabulka č. 1). Tyto receptory zprostředkovávají analgetický účinek morfinu, ale i např. vliv morfinu na dechovou depresi (Minami et al., 1995). Zajímavá je i aktivace κ -opioidních receptorů, která se dává do souvislosti a rozvojem depresivního a averzivního chování během závislosti a abstinenci syndromu po vysazení morfinu (Zan et al., 2015). Tyto receptory se nacházejí v celé řadě níže zmíněných oblastí vztahujících se k působení morfinu, jako je např. nucleus accumbens, (Zan et al., 2015), kortex, thalamus, raphe nuclei, locus coeruleus a mícha (Minami et al., 1995). Nicméně pouze v některých částech mozku jsou kolokalizovány všechny tři podtypy (Minami et al., 1995). Morfin, stejně jako další opiáty, tedy ovlivňuje funkci tzv. *endogenního opioidního systému*, kam tyto receptory řadíme. To znamená, že imituje působení endogenních opioidů, jako jsou endorfiny či enkefaliny, které mají schopnost omezovat vnímání bolesti či navozovat euforii (Nummenmaa et al., 2017).

Tabulka č. 1 **Schopnost vazby morfinu na receptory opioidního systému**

Receptory	μ	kappa	delta
MORFIN (Ki)	0,92 nM	242 nM	56 nM

Ki – disociační konstanta. Upraveno dle (Zadina et al., 2016)

Přes vazbu na tyto receptory je morfin schopen vyvolávat změny na buněčné úrovni. Signalizační kaskáda začíná po navázání ligandu (morfinu) na patřičný receptor, který je asociován s trimerním G-proteinem typu Gi/o (Skrabalova et al., 2013). Vlivem α -podjednotky tohoto G-proteinu následně dochází k inhibici aktivity enzymu adenylylcyklázy (AC), který jinak produkuje cyklický adenosin monofosfát (cAMP) (Skrabalova et al., 2013). Hladina této signální molekuly tedy klesá, což vede k různým buněčným odpovědím. Podjednotky $\beta\gamma$ G-proteinu jsou schopny přímo ovlivňovat otevření iontových kanálů, čímž vyvolávají hyperpolarizaci buňky (Skrabalova et al., 2013). Schématicky je tato signalizační kaskáda naznačena na obr. č. 3.



Obr. č. 3 **Signalizační kaskáda morfinu**. Upraveno podle (Skrabalova et al., 2013). AC – adenylylcykláza, ATP – adenosin trifosfát, cAMP – cyklický adenosin monofosfát, G_{α} – α podjednotka trimerního G-proteinu, ADP – adenosin difosfát, $\beta\gamma$ – $\beta\gamma$ podjednotka G-proteinu, PM – plazmatická membrána.

1.1.5. Vliv morfinu na CNS

Morfin působí, přímo i nepřímo, i na řadu neurotransmiterových systémů. Toto působení pak vyvolává různé, často nežádoucí, účinky této látky. Příkladem neurotransmiterového systému, na který má morfin vliv, je systém serotonergní; administrace morfinu způsobuje výlev serotoninu např. v NAc, amygdale či hipokampu (Tao, 1995). Dále se jedná především o vliv na dopaminergní systém odpovědný za vznik závislosti; toto působení je rozebráno v samostatné kapitole (Morfin a závislost 1.1.3.1.).

Klinicky relevantní je především působení morfinu na nocicepční systém, a to skrze opioidní neurotransmiterový systém. Nocicepce je proces zachycení (pro jedince potencionálně škodlivé, nebezpečné) informace receptory, její převod do CNS, zpracování a následná odpověď organismu.

Tento systém vyvolává vjem bolesti. Bolest je komplexní vjem, na kterém kooperuje řada struktur v PNS i CNS. Má senzoricou a afektivní komponentu tak, aby jedince motivoval se bolestivému podnětu pro příště vyhnout. Dráha bolesti vede od volných nervových zakončení rozmístěných téměř všude po těle do zadního rohu míchy a dále spinothalamickým traktem do thalamu (Garland et al., 2012). Odtud je informace vedena do několika struktur – kortexu, amygdaly, insuly, hypothalamu, periakveduktální šedi či bazálních ganglií (Garland et al., 2012). Nicméně nocicepce nemusí vždy vyústit ve vjem bolesti. V rámci dráhy, která vede vjem bolesti, existují místa, kde se informace může modulovat, např. skrze ovlivnění descendentní dráhy přes medulu (Garland et al., 2012). Modulaci, respektive potlačení bolesti, zprostředkovává také farmakologická skupina analgetik. Konkrétně morfin způsobuje analgézi v zadních rozech míchy, a to stejným způsobem jako endogenní opioidy. Přes vazbu na MOR navozuje hyperpolarizaci GABA-interneuronů, což vede k utlumení aktivity excitačních buněk (Lipp, 1991). Tyto buňky přenášejí vjem bolesti a snížením jejich aktivity se tedy bolest snižuje. Druhým mechanismem je přímo snížení výlevu neurotransmiterů těchto excitačních buněk, což opět vede k snížení jejich aktivity a poklesu bolesti (Lipp, 1991).

Morfin je kromě systému nocicepce schopen ovlivňovat řadu dalších oblastí CNS, například systémy podílejících se na kontrole kognitivních funkcí, metabolismu či imunity. Výrazným příkladem jsou změny vyvolané v limbickém systému. Zde morfin způsobuje alterace ve funkci hipokampu; dochází k remodelacím synapsí, narušuje se dlouhodobá potenciace³ (Han et al., 2015). Opiáty obecně mění na buněčné úrovni charakteristiku nervového vzruchu, snižují jeho amplitudu a zpomalují jeho průběh (Liu et al., 2014). Dalším příkladem ovlivnění struktur mozku během rozvoje závislosti je prokázaná změna konektivity mezi hippokampem, amygdalou, NAc, VTA a kortexem u pacientů závislých na heroinu (Jiang et al., 2016; Zhai et al., 2014). V hipokampu také pod vlivem morfinu dochází ke vzniku nových paměťových stop a následně souvisejících behaviorálních odpovědí vztahujících se k užíváním drogy (Esmacili et al., 2012). Ovlivnění funkce těchto struktur bylo ale prokázáno i u dalších návykových látek (Wilkinson et al., 2013).

³ Dlouhodobá potenciace (long-term potentiation, LTP) je změna charakteru nervového vzruchu, považuje se za elektrofyziologický podklad učení.

1.2. Neuroplastické změny

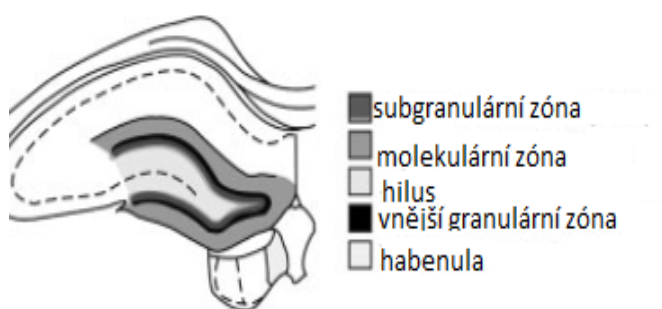
Neuroplastickým potenciálem rozumíme schopnost mozku měnit sílu a efektivitu přenosu jednotlivých synapsí, vznik nových synapsí a zároveň vznik nových buněk z prekursorů, jež mozková tkáň obsahuje. Tato schopnost je zachována i v dospělém mozku a byla popsána již v roce 1949 Donaldem Hebbem. Neuroplastické děje můžeme dělit na: *neuroplasticitu* v užším slova smyslu, tedy děj, který mění funkční vlastnosti již existujících synaptických spojů; dále *synaptogenezi*, tedy vznik nových synapsí mezi neuronálními buňkami; a *neurogenezi* neboli vznik nových buněk, které se následně zapojí do již fungujících neuronálních sítí. Plasticita mozku je ovlivňována celou řadou vlivů. Pozitivně na neuroplastické změny působí např. antidepressiva (Meneghini et al., 2014), negativní vliv mají naopak např. stres či psychická onemocnění (Cassano et al., 2010). Dalším aspektem ovlivňujícím neuroplasticitu jsou návykové látky. Ačkoliv se abúzus drog často zařazuje mezi vlivy negativně působící na neuroplastické změny, situace je poněkud složitější. Drogy obecně způsobují celou řadu neuroadaptačních procesů, jejichž bližší charakterizace je nutná pro pochopení vzniku a následně i léčby závislostí. Pozornost je ve výzkumu věnována často limbickému systému a kortikálním strukturám, konkrétně např. tzv. okruhu odměny (viz výše) (Patel et al., 2013), kde jsou tyto neuroadaptační procesy neurobiologickým podkladem rozvoje závislost. Další vědecké práce se zaměřují i na změny hipokampu, tedy významné neuroplastické oblasti. Po podání drog totiž tato struktura vykazuje také významné změny a spekuluje se o její úloze v behaviorálních odpovědích na drogy či relapsu (Jiang et al., 2016).

Vzhledem k tomu, že v této diplomové práci se zabývám pouze vlivem morfinu na neurogenezi, problematiku ostatních neuroplastických změn se zde nebudu podrobněji zabývat a v následující kapitole se zaměřím se pouze vysvětlení principů neurogeneze.

1.2.1. Neurogeneze

Jako neurogenezi označujeme děj, který spočívá ve vzniku nových nervových buněk (neuronů i glií) dělením prekursorových buněk (tzv. neuronálních kmenových buněk – NSC) obsažených v malém množství v nervové tkáni. Tento děj je zásadní především při vývoji CNS v prenatálním a raném postnatálním vývoji, nicméně probíhá i v adultním mozku. Množství nových buněk vznikajících během života, resp. jejich úbytek, prokazatelně souvisí s kognitivními funkcemi např. s učením a pamětí (Recinto et al., 2011). V dospělosti je neurogeneze lokalizována především ve dvou oblastech. Za prvé to je v oblastech hipokampu, především v subgranulární zóně (SGZ) gyru dentatu (viz obr. č. 4), nicméně nové buňky vznikají i dalších podoblastech této struktury, např. hilu (viz obr. č. 4) (Kahn et al., 2005). Dále pak neurogeneze probíhá v subventrikulární zóně (SVZ) laterálních komor. Buňky vzniklé v SGZ migrují do granulární zóny hipokampu a buňky ze SVZ migrují do čichového bulbu, kde se zapojují do funkčních okruhů těchto struktur (Rosa-Prieto et al., 2015). Velice omezené

množství NSC se zřejmě vyskytuje i v dalších oblastech NS např. v míše, či corpus callosum nicméně neurogeneze zde zřejmě neprobíhá konsitativně či jen v zanedbatelné míře (Eisch et al., 2000). Neurogeneze je stejně jako ostatní neuroplastické změny ovlivňována řadou vlivů. Nárůst neurogeneze mohou překvapivě zapříčinit i patologické okolnosti, např. ischemie (Wang et al., 2011). Pokles způsobují např. návykové látky jako metanfetamin (Yuan et al., 2011). Ztráta buněk v NS koreluje se sníženými kognitivními schopnostmi závislých zvířat (Recinto et al., 2011).



Obr. č. 4 Oblasti gyrus dentatus hipokampu.

Schématické znázornění podoblastí gyru dentatu (DG) hipokampu potkana v antero-posteriorní ose. Upraveno podle (Eisch et al., 2006).



Obr.č. 5 Subventrikulární zóna. Schéma koronárního řezu mozku potkana. LV – laterální komora, SVZ – subventrikulární zóna. Převzato z (Fiorelli et al., 2015).

1.2.2. Neurogeneze po podání morfinu

Neurogenezi ovlivňují různé neurotransmitterové systémy včetně opoidního systému (Meneghini et al., 2014). Kromě vlivu působení exogenních opoidních látek mozek využívá v regulaci buněčné proliferace i vlastní syntézu endogenních opoidních látek (Kolodziej et al., 2008). Obecně by se dalo říci, že se při chronickém podávání popisuje u opiátů (ale i jiných drog) snížení neurogeneze. Nicméně, je třeba podotknout, že výsledky studií zabývajících se změnami neurogeneze po podání morfinu se výrazně liší (viz tabulka 2). Různé výsledky jsou zřejmě způsobeny celou řadou metodických odlišností v jednotlivých studiích; ne jen odlišným dávkováním a délkou administrace, ale i způsobem

aplikace morfinu. Kromě toho i podmínky vnějšího prostředí během aplikace drogy zřejmě ovlivňují vliv morfinu na míru neurogeneze (Zhang et al., 2016). Například bylo prokázáno, že přivyknutí určitému prostředí při aplikaci drogy, kdy se vyvine paměťová stopa, která dává do souvislosti toto prostředí s aplikací drogy, může vést k poklesu počtu nových granulárních buněk (Zhang et al., 2016). Oproti tomu u stejné dávky morfinu, kdy při aplikaci bylo zvíře ponecháno ve své kleci, nebyla žádná změna zaznamenána (Zhang et al., 2016). I u jiných návykových látek byl popsán různý vliv na neurogenezi v závislosti na administrativním schématu (Recinto et al., 2011).

Jak bylo řečeno výše, morfin působí přes MOR, které jsou v hipokampu a laterálních komorách exprimované i v SGZ a SVZ, a to jak neurony, tak astrocyty a zároveň i prekursorovými buňkami (Gobin et al., 2001; Meneghini et al., 2014; Drake & Milner, 2002). Některé recentní práce poukazují na ovlivnění hipokampálních struktur přes tyto receptory. Bylo např. prokázáno, že MOR signalizace v hipokampu zvyšuje proliferaci progenitorových buněk v této struktuře (Sargeant et al., 2008). Oproti tomu bylo v jiné studii prokázáno, že MOR deficientní myši, vykazují vyšší míru přežívání nových neuronů (fyziologicky přežívá asi polovina (Dayer et al., 2003; Harburg et al., 2007), ačkoliv proliferace a diferenciaci těchto buněk zůstává nezměněná (Harburg et al., 2007)).

Většina studií zaměřujících se na tuto problematiku se zabývá oblastí SGZ. O oblasti SVZ lze dohledat minimum literatury, nicméně výsledky naznačují, že tato oblast je k působení návykových látek do značné míry imunní (Nixon et al., 2004). Ani po chronickém podávání morfinu se v SVZ neprokázalo snížení míry neurogeneze (Eisch et al., 2000).

Studie zabývající se vznikem nových buněk v SGZ hipokampu můžeme rozdělit podle délky a způsobu podávání morfinu. Akutní schéma podávání morfinu nevedlo k ovlivnění míry neurogeneze (i.p., 10 mg/kg) (Eisch et al., 2000). Stejný závěr byl učiněn v další studii, kde ani vyšší dávka morfinu nevedla po jedné aplikaci k žádnému účinku na neurogenezi (i.p. 20 mg/kg) (Fischer et al., 2008). Chronickým schématem aplikace se zabývá více experimentálních studií. Chronická expozice morfinu zřejmě podíl přežívajících buněk snižuje. V některých studiích byl prokázán pokles téměř na polovinu normální proliferace (Eisch et al., 2000). Negativní vliv na neurogenezi byl popsán u studií, v nichž byl morfin aplikován ve formě subkutánních pelet (Zhang et al., 2016) nebo intraperitoneální injekcí (Kahn et al., 2005), jak popisují výsledky následujících studií (přehled - viz tabulka č. 2). Některé studie potvrzují snížené přežívání neuronů po chronické aplikaci morfinu pouze v SGZ. V další neurogenetické oblasti hipokampu (hilu) zůstal počet buněk nezměněn (Eisch et al., 2000). Ke stejnému závěru dospěla i studie Kahn, et al., kde bylo snížení neurogeneze pozorováno také pouze v SGZ, a to o 45% oproti kontrolám (Kahn et al., 2005). Naopak byly vypracovány studie, kde ani stupňující se dávky morfinu 5 dní (i.p., celkem 420 mg/kg) a 10 dní (i.p., celkem 1230 mg/kg) nevedly ke snížení dělení buněk, ale naopak byl pozorován mírný trend směrem ke zvýšení dělících se buněk. Tento trend byl pozorován překvapivě především u nejdelší administrace (Fischer et al., 2008). Tento rozdíl může souviset

s odlišnými hladinami morfinu v závislosti na způsobu podání - relativně stabilními hladinami morfinu u pelet na rozdíl od injekční aplikace, kdy po počáteční vysoké koncentraci hladina morfinu postupně klesá (Fischer et al., 2008). Kromě toho jsou pelety schopny vyvolat silnější závislost než injekce (Fischer et al., 2008).

U morfinu však nebylo pozorováno jen snížení výskytu nových neuronálních buněk, ale i ovlivnění diferenciacie zárodečných buněk. Bylo totiž prokázáno, že tento opiát má modulační vliv na proliferaci buněk, a to takový, že preferenčně dochází ke vzniku nových glií na úkor vzniku nových neuronálních buněk (Xu et al., 2014; Xu et al., 2015).

Tabulka č. 2 **Přehled studií zabývajících se vlivem chronického morfinu na neurogenezi**

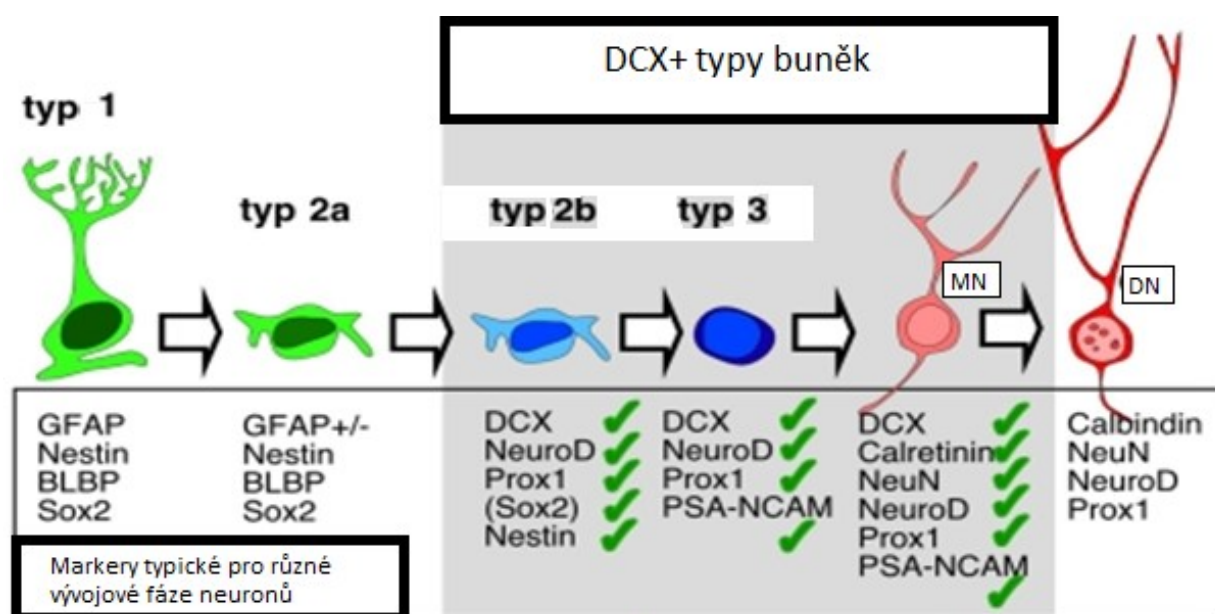
Studie	Model	Dávka	Způsob administrace	Doba	Výsledek na proliferaci
Kahn et al., 2005	potkan	2 x 20 mg/kg	i.p.	7 dní (2x denně)	Redukce
Fisher et al., 2008	Potkan, myš	12,5 mg/kg (s.c.), 10-100 mg/kg	s.c. pelety, i.p.	4 dny (s.c.), 2-10 dní (i.p.)	Redukce u pelet, nárůst u injekcí
Arguello et al., 2008	myš	12,5 mg/kg (s.c.),	s.c. pelety	4 dny	redukce
Zhang et al., 2016	myš	5 mg/kg	s.c. injekce	4 dny	Redukce/žádná změna
Eisch et al., 2000	potkan	15 mg/kg	s.c. pelety,	5 dní	Redukce

s.c. - subkutánně, i.p. - intraperitoneálně.

Dle experimentálních výsledků se zdá, že morfin možná ovlivňuje selektivně pouze některé aspekty neurogeneze, resp. pouze některé její fáze (Arguello et al., 2008). Množství buněk v S-fázi (tzn. dělící se buňky) bylo při administraci morfinových pelet celkově sníženo. Další analýza ukázala, že konkrétně došlo ke snížení množství maturujících nezralých neuronů (typ 3) a naopak k nárůstu počtu buněk stádia 2-b, tedy mladších buněk (viz obr. č. 6) (Arguello et al., 2008). Výsledky této studie

naznačují, že k působení morfinu je tedy vnímavá celá populace DCX+ buněk ⁴, nicméně negativně je zřejmě ovlivněna jen definitivní maturace nezralých neuronálních buněk. Stejně tak v další studii byl zaznamenán pokles jen zralejších DCX+ buněk, u ranějších stádií neuronů nebyla ale žádná změna pozorována (Zhang et al., 2016). Další studie poukazuje na fakt, že chronická aplikace morfinu snižuje kromě proliferace i samotné přežívání buněk v různých oblastech hipokampu (Eisch et al., 2000). To je výsledek, který by mohl vysvětlovat, proč předcházející studie prokázaly úbytek právě starších vyvíjejících se neuronů. Naopak u krátkodobé expozice morfinu studie dospěly k opačnému výsledku - u buněk byl prokázán pokles nestin⁺ ⁵ buněk a nárůst pozdějších buněčných typů (Willner et al., 2014).

Morfin také negativně působí na další aspekt podstatný pro úspěšnou maturaci neuronů - dendritické větvení nově vznikajících buněk (Meneghini et al., 2014). Snižování dendritického větvení buněk v hipokampu při chronickém podávání morfinu prokázaly i další studie (Yang et al., 2013).



Obr. č. 6 Fáze vývoje maturujících neuronů a příslušné markery pro ně typické. MN – maturující neuron, DN – dospělý neuron. Upraveno podle (Knoth et al., 2010).

Mechanismus, jakým je zprostředkován negativní efekt morfinu na neurogenезi, popsáný ve většině studií, zatím není plně odhalen. Jednou z možností se zdálo být vyvolání stresové reakce, kterou způsobuje aplikace drog včetně morfinu (Goeldner et al., 2011). Nicméně experimentální výsledky, jak dokládá studie provedená na potkanech, naznačují, že vliv drogy na zvýšení hladiny glukokortikoidů

⁴ DCX neboli doublecortin je marker, který exprimují mladé zrající neuronální buňky.

⁵ Nestin je marker neuronálních prekursorů a raných vývojových stádií neuronů.

(stresových hormonů), zřejmě není mechanismem působícím na neurogenezi (Eisch et al., 2000). Dalším možným mechanismem by bylo ovlivnění exprese neuropastických faktorů jako je BDNF (Brain-derived neurotrophic factor). Nicméně u myši nebyla prokázána změna hladiny ani pro-proliferčního BDNF ani proti-proliferčního interleukinu 1- β (s.c., 12,5 mg/kg. po 4 dny) (Arguello et al., 2009). Chroničtější a vyšší dávky (i.p., 15-45 mg/kg po 21 dní) ale k nárůstu interleukinu 1- β vedly (Motaghinejad et al., 2015).

1.2.3. Vliv vysazení morfinu na neurogenezi

Abstinenční syndrom po vysazení morfinu je charakterizován některými aspekty, které mohou ovlivňovat míru neurogeneze. Jedná se např. o zvýšenou aktivitu stresové osy (hypothalamus-hypofýza-nadledviny). Po vysazení morfinu se významně zvyšuje hladina kortizolu (Motaghinejad et al., 2015). Experimentální data poukazující na tuto spojitost nicméně chybí, ale během samotné závislosti na morfinu byla souvislost mezi glukokortikoidy a mírou proliferace buněk vyvrácena (viz výše). Dalším aspektem, který by mohl vznik nových buněk narušovat je deprese; depresivní stavy mají totiž tendenci snižovat neurogenezi (Pittenger et al., 2008). Během několika týdnů po vysazení došlo u myši (20-100 mg/kg, s.c. po 6 dní) k rozvoji depresivních symptomů, trend byl patrný již týden po vysazení a narůstal do doby 1 měsíce po vysazení drogy (Zan et al., 2015). Ačkoliv tyto aspekty abstinenčního syndromu by poukazovaly spíše na očekávané snížení hladiny neurogeneze, ve studiích byla pozorována naopak spíše tendence ke zvýšení proliferace (Kahn et al., 2005). Nicméně tento nárůst se vrátil rychle do normy; již dva týdny po vysazení morfinu (Kahn et al., 2005). Nárůst počtu nových buněk byl zdokumentován také po vysazení jiných návykových látek (Recinto et al., 2011).

Trend ke zvýšení proliferace pozorovaný v některých studiích ale nemusí nutně souviset s vysazením morfinu jako takovým. Po vysazení je totiž možný výskyt záchvatů, které se mohou vyskytovat během abstinenčního syndromu a které samy o sobě mohou vyvolat zvýšení neurogeneze (Makiura et al., 1999). Jiným mechanismem tohoto pochodu by mohlo být i to, že nárůst neurogeneze lze pozorovat i po některých patologických procesech, pravděpodobně jako snahu CNS vyrovnat se s předcházející ztrátou buněk, jako to lze vidět např. po ischemii (Wang et al., 2011). Nárůst počtu buněk by tedy mohl být určitým kompenzačním mechanismem mozku ve snaze nahradit ztráty buněk, ke kterým došlo po dobu závislosti na droze.

1.3. Neurodegenerace

Neurodegeneraci bychom mohli obecně definovat jako děj vedoucí k poškození a následnému zániku struktury nebo určité funkce v centrální či periferní nervové soustavě. Tento děj úzce souvisí se ztrátou neuronálních buněk. Jelikož dospělé neuronální buňky již nemají schopnost dělení, zánik jejich velkého množství může být pro mozkovou tkáň značně devastující a může narušit normální fungování NS. Takovéto rozsáhlé poškození můžeme vidět u některých neurodegenerativních onemocnění, např. u Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby či amyotrofické laterální sklerózy. Tato onemocnění tvoří skupinu chorob, jejímž společným faktorem je vznik proteinových deposit a progresivní zánik specifických neuronálních populací (Saxena et al., 2011). V kontextu těchto chorob a obecně u neurodegenerace se diskutuje úloha stresu (Saxena et al., 2011). Zároveň je ale potřeba říci, že degenerace je děj, který probíhá v organismu i za zcela fyziologických podmínek, např. při stárnutí organismu (Tatarkova et al., 2016). Také v oblastech mozku, kde dochází ke zrodu nových buněk (SGZ a SVZ), dochází ke smrti značného podílu z nově vzniklých buněk zcela fyziologicky; pouze zhruba 50% nově vzniklých neuronů přežívá, maturuje a následně se zapojuje do neuronálních okruhů (Dayer et al., 2003).

Agens, která vyvolávají poškození nervových buněk, působí tzv. neurotoxicky. Neurotoxická, která může vést až k degeneraci nervové tkáně, byla definována jako „široký koncept zahrnující nepříznivé účinky na strukturu či funkci centrálního a/nebo periferního nervového systému způsobené biologickým, chemickým nebo fyzikálním podnětem“ (Cunha-oliveira et al., 2008). Když bychom tento koncept převedli na buněčnou úroveň, tak zjistíme, že existuje několik prostudovaných mechanismů, které v buňce mohou působit nepříznivě či „toxicky“ a vést až k jejímu zániku. Jedná se např. o excitotoxicitu, zvýšení produkce volných kyslíkových radikálů (ROS), snížení ochranných (antioxidačních) mechanismů buňky, vyvolání odpovědi imunitního systému (např. zánět), aj.

Jak již bylo řečeno v předchozích kapitolách, konzumace drog vede k narušení celé řady buněčných mechanismů, takže i při vystavení nízkým dávkám drogy, které samy o sobě nejsou pro tělo toxické, může při dlouhodobé expozici toto narušení buněčných funkcí vést až k zániku buňky. Toto dokládají i výsledky studií, kdy degenerace byla prokázána především po chronickém podávání různých drog (Kiyatkin et al., 2013; Ellison, 2002), přičemž míra poškození záleží na množství podané látky a době, po kterou byl organismus vystaven působení drogy. Obecně lze říci, že i akutní aplikace drog je schopna vyvolat neurotoxickou reakci v buňkách, pokud je dávka dostatečně velká. Naopak při dlouhodobém užívání drog jsou poruchy funkce buněk časté a jsou podkladem pro pozorované změny psychické i somatické. Např. kognitivní deficity popsané u dlouhodobých uživatelů návykových látek mohou být zapříčiněny právě ztrátou buněk v oblastech CNS, které tyto funkce zprostředkovávají (Recinto et al., 2011). Drogy působí degeneraci v různých mozkových oblastech, např. striatu, hipokampu či kůře (Ellison, 2002).

1.3.1. Degenerace po podání morfinu

Existuje řada studií zabývajících se vlivem opiátů na poškození buněk. V této části cituji i studie zabývající se jinými opiáty než morfinem, citované studie se zabývají heroinem (diacetylmorfinem) a ten se v těle rozpadá na dva základní metabolity – morfin a 6-monoacetylmorfin (Cunha-oliveira et al., 2008). Vzhledem k podobné chemické struktuře zde tedy závěry těchto studií prezentuji jako relevantní i pro příbuznou molekulu morfinu.

Je známo, že některé drogy působí vysoce selektivní zánik konkrétních populací neuronů, např. MDMA (3,4,-methylenedioxy-N-methanfetamin, „extáze“) způsobuje smrt serotonergních neuronů (Obrocki et al., 2002). Oproti tomu u morfinu, potažmo jiných opiátů, nebyla žádná taková selektivita, ať už ohledně neurotransmiterového systému či konkrétní struktury prokázána (Atici et al., 2004). Morfin nepůsobí selektivně zánik konkrétních populací buněk CNS; nezpůsobuje degeneraci pouze neuronálních ale i gliových buněk (Hauser et al., 2009). Degenerace byla po dlouhotrvajícím podávání morfinu prokázána v řadě oblastí např. i v oblastech okruhu odměny (Shi et al., 2015), hipokampu či kortexu (Atici et al., 2004). Je ale třeba poukázat na to, že droga působí degeneraci značně nespecificky, pokud jsou použity vysoké dávky po krátkou dobu a naopak působí selektivněji při dlouhodobé aplikaci menších dávek (Ellison, 2002). Vliv morfinu na buněčnou smrt byl prokázán v experimentech in vitro (Litmala, 2016), in vivo (Motaghinejad et al., 2015) i u pacientů dlouhodobě užívajících opiáty (Breivik, 2001). Míra degenerace tkáně je závislá na podané dávce (Litmala, 2016). Nicméně morfin není mezi léky výjimkou; i ostatní opiáty běžně užívané k tišení bolesti způsobují při delším užívání neurodegenerativní změny, a to v míře srovnatelné, v některých oblastech dokonce v míře vyšší než morfin (Atici et al., 2004).

Zajímavá je studie Arguello et al., která ukazuje, že počet umírajících buněk je po podání morfinu zvýšen krátce po expozici morfinu (24 hod), ale vrací se k normě již 96 hodin po podávání této látky (Arguello et al., 2008). Ve studii Meneghini et al. bylo zjištěno, že degenerující buňky po podání morfinu podléhaly apoptóze⁶ a nikoliv nekrotické smrti (Meneghini et al., 2014). I v další studii podávání morfinu vyvolalo nárůst apoptotických makrerů, konkrétně kaspáz 3 a 9 (Motaghinejad et al., 2015). Kromě toho tato studie prokázala i výskyt zánětlivých markerů IL- β , TNF- α (Motaghinejad et al., 2015), což svědčí o tom, že dlouhodobá konzumace morfinu vyvolává v těle odpověď imunitního systému.

Jak dokládají následující příklady, výsledky studií naznačují, že apoptotická smrt neuronů vystavených působení morfinu, může být způsobena prostřednictvím některých cytotoxických mechanismů uvedených výše. Tento mechanismus, je navíc zřejmě závislý na opioidních receptorech,

⁶ Apoptóza – vysoce organizovaný typ buněčné smrti.

konkrétně na MOR; při současném podání naltrexonu⁷ totiž nebyla degenerace pozorována (Meneghini et al., 2014).

Prvním způsobem, který lze vyvolat buněčné poškození až smrt, je nefyziologické zvýšení hladiny intracelulárního vápníku. To úzce souvisí s mechanismem, který často vede k buněčné smrti při řadě patologických stavů (např. iktus), a to s tzv. excitotoxicitou. To je děj je asociovaný s vysokou extracelulární hladinou excitačního neurotransmiteru glutamátu, který skrze zvyšování intracelulární hladiny vápníku vede až k buněčné smrti (Hemstapat et al., 2003). Tento mechanismus dokládá, že jedním ze zásadních mechanismů signalizace a zároveň udržování homeostázy v buňce je udržování, potažmo změna koncentrace, intracelulárního kalcia. Opiáty (heroin) při opakovaném podávání narušují hladiny vápníku v buňce a také byla prokázána korelace mezi velikostí jeho intracelulární koncentrace a poškozením buněk (Liu et al., 2014). U potkanů s rozvinutou tolerancí vůči účinkům morfinu (i.t., 10-20 µg, po 7 dní) byla pozorována apoptóza buněk v míše způsobená mechanismem závislým na glutamátergních receptorech (Mao et al., 2002). Ačkoliv mechanismus zvyšování intracelulárních hladin Ca^{2+} morfinem není plně odhalen, studie naznačují, že tento děj nemusí způsobovat jen skrze glutamátergní systém. Existuje např. studie zabývající se vlivem morfin-3-glukuronidu, jednoho z hlavních metabolitů morfinu (viz výše), na buněčnou smrt. Tento výzkum prokázal, že tento metabolit sice významně zvýšil hladinu vápníku v buňce, nicméně smrt buněk nevyvolal (Hemstapat et al., 2003). Pokud by tedy buněčnou smrt způsobovalo narušení homeostázy vápníku v buňce, bylo by možné spekulovat, že zánik buněk vyvolává druhý, fyziologicky aktivní, metabolit, na který se morfin v těle rozpadá, tedy morfin-6-glukuronid.

Dalším mechanismem, který se v souvislosti s užíváním morfinu zkoumá, je oxidativní stres. Jedná se o stav, kdy je v buňce přítomno vysoké množství reaktivních kyslíkových molekul – tzv. kyslíkových radikálů - a antioxidační ochrana buňky je nestačí eliminovat. Mezi tyto nestabilní molekuly řadíme např. peroxid vodíku (H_2O_2) či hydroxylový radikál (OH^\cdot). Tyto radikály pak napadají okolní molekuly v buňce (např. DNA) a poškozují je. Pokud dojde k narušení struktur zásadních pro buněčné přežívání, buňka může zaniknout. Organismus má za normálních okolností značnou schopnost radikály metabolizovat pomocí antioxidačních enzymů na stabilní molekuly, a tak chránit buňku před jejich negativním působením. K těmto enzymům řadíme např. superoxid dismutázu (SOD), glutathion (GSH), glutathion peroxidázu (GSHPx) či katalázu (CAT) (Skrabalova et al., 2013). Při řadě patologických stavů však dochází k tak velkému nárůstu radikálů či zásadnímu ochabnutí antioxidační ochrany, že se rozvíjí oxidační stres. K těmto stavům řadíme např. stres či různé patologie (Pittenger et al., 2008). Abúzus drog je také považován za jednu z příčin vyvolávajících oxidativní stres v buňce. V souladu s tímto tvrzením byly tyto změny prokázány i u morfinu. Zdá se, jak dokládají následující studie, že morfin působí jak zvýšení hladiny radikálů v buňce, tak i snižuje antioxidační ochranu buňky.

⁷ Naltrexon – antagonist MOR.

Chronicky aplikované vysoké dávky morfinu (s.c., 45 mg/kg, po 4 týdny) vyvolávají značnou patologickou odpověď na několika úrovních – byly nalezeny markery signalizující poškození buněčných membrán (lipoperoxidace), snížení antioxidační ochrany buněk (SOD, glutathion peroxidáza). Kromě toho tato studie prokázala výskyt apoptotických markerů (kaspáza 3, kaspáza 9) (Motaghinejad et al., 2015).

Ačkoliv lze obecně říci, že chronické podávání morfinu způsobuje negativní změny na buněčné úrovni a způsobuje stresovou zátěž organismu, různá dávkovací schémata vyvolávají různou míru poškození buněk (Motaghinejad et al., 2015). Přehled výsledků studií s různými experimentálními paradigmaty je uveden v tabulce 3. Existují i studie, které vliv morfinu na umírání buněk neprokázaly (Kahn et al., 2005). Např. u mladých potkanů (do postnatálního dne 15) nebylo prokázána aktivace kaspáz ani buněčná smrt u akutního ani chronického podávání morfinu (Massa et al., 2012). U této studie by se dalo spekulovat, zda přežívání buněk není dáno extrémní odolností mladého organismu, avšak i další studie s dospělými zvířaty dospěly k podobným výsledkům. Např. ve studii Kahn et al., nebyla pozorována degenerace neuronálních buněk (Kahn et al., 2005).

Tabulka č. 3 **Přehled studií zabývajících se efektem morfinu na neurodegeneraci**

Studie	Model	Dávka	Způsob administrace	Doba administrace	Výsledek na degeneraci
Kahn et al., 2005	potkan	2 x 20 mg/kg	i.p.	7 dní (2x denně)	Žádná změna
Motahinejad et al., a, 2015	potkan	45 mg/kg	s.c. injekce	28 dní	degenerace
Motaghinejad et al., b, 2015	potkan	15-45 mg/kg	i.p.	21 dní	degenerace
Mao et al., 2002	potkan	1 µl/hod (kontinuální infúze); 10-20 µg (bolus, 2x denně)	i.t.	7 dní	degenerace
(Litmala, 2016)	buňky	0,5-2 mM	-	4 dny	degenerace
Atici et al., 2004	potkan	4-12 mg/kg	neuvedeno	30 dní	degenerace
Hemstapat et al. 2003	buňky	0,5-50 µM	-	24 hodin	Žádná degenerace
Massa et al., 2012	potkan	1-10 mg/kg	i.p.	1 aplikace	Žádná degenerace

i.p. – intraperitoneálně, s.c. – subkutánně, i.t. – intratekálně

1.4. Vliv morfinu na vybrané neuromodulátorové systémy

Opiáty ovlivňují řadu peptidických hormonů, např. leptin, insulin či testosteron, skrze něž narušují řadu neuronálních funkcí (Houshyar et al., 2004). Proto jsme vybrali několik neuromodulátorů, které tyto funkce ovlivňují a zároveň jsou popsány interakce mezi drogami a těmito neuromodulátorovými systémy. Níže jsou uvedeny příklady studií zabývajících se ovlivněním těchto systémů ve vztahu k podávání morfinu.

1.4.1. Cholecystokinin

Cholecystokinin (CCK) je peptid, který se v organismu vyskytuje v několika alternativních formách o různé délce. V CNS je predominantní formou cholecystokinin-8 považovaný za endogenního antagonistu opioidů (Zhou et al., 1993). Byly zmapovány interakce mezi opioidním, cholecystokininovým a dopaminergním systémem (Noble et al., 2011). Také se významně uplatňuje v paměťových funkcích, má např. pozitivní vliv na LTP, které je narušováno morfinem (Wen et al., 2014). Sám o sobě i při současném podávání morfinu je schopen zlepšit paměť v behaviorálních testech (Yang et al., 2013). Mezi těmito dvěma látkami probíhají v CNS různé interakce. Chronicky podávaný morfin zvyšuje syntézu samotného cholecystokininu i jeho receptory a ovlivňuje vznik morfinové závislosti (Wen et al., 2012). Antagonisté CCK receptorů zabráňují rozvoji morfinové tolerance (Kim et al., 2001; Xiong et al., 2006). Tato látka je schopna snížit také projevy behaviorální senzitivace⁸ po dlouhodobém podávání morfinu (Wen et al., 2013).

1.4.2. Neuropeptid Y

Neuropeptid Y (NpY), je 36 aminokyselin dlouhá peptidická látka exprimovaná v inhibičních nervových buňkách (Makiura et al., 1999). V mozku se vyskytuje v řadě oblastí: bazálních gangliích, periaquedukální šedi, hipokampu, amygdale, NAc (Thorsell et al., 1998; Holzer et al., 2012). Kromě CNS se vyskytuje i v gastrointestinálním systému. Její funkcí je např. potravní chování. V této souvislosti má zřejmě „odměňující úlohu“ (Brown et al., 2000). Nicméně má řadu dalších funkcí; např. kooperuje s imunitním systémem (Holzer et al., 2012). Kromě toho je uváděna do souvislosti s řadou patologických stavů jako je deprese, anxiety a abúzus drog (Holzer et al., 2012; Gonçalves et al., 2015). Zdá se, že u některých drog posiluje závislost, u jiných ji naopak může tlumit (Gonçalves et al., 2015). Např. podání neuropeptidu Y zvýšilo závislost na kokainu u potkanů (Maric et al., 2009). Zejména se však diskutuje jeho souvislost s tzv. syndromem z vysazení. Krátce po vysazení (12 hod) byla zaznamenána výrazně snížená hladina a naopak po 8 dnech od vysazení morfinu bylo zaznamenáno zvýšení hladin neuropeptidu Y v hypothalamu (Houshyar et al., 2004). Při těchto stavech je schopen tlumení behaviorálních příznaků abstinčního syndromu (Woldbye, Klemp, & Madsen, 1998). Při

⁸ Behaviorální senzitivace – jev partný po dlouhodobém podávání návykových látek charakterizovaný výraznou odpovědí organismu i na nízkou dávku drogy.

stresu byla naopak pozorována snížená hladina NpY (Thorsell et al., 1998). Působení morfinu na hladiny neuropeptidu Y se liší v různých oblastech CNS. Po jeho chronické aplikaci byl zaznamenán pokles v hypothalamu a striatu, ale naopak nebyla zaznamenána změna hladin v kortexu či hipokampu (Pages et al., 1991).

2. Cíle práce

Podstatnou náplní mé práce na této diplomové práci bylo zavedení a následná optimalizace metod pro použití jednotlivých protilátek a také fluorochromu Fluoro-Jade C, které doposud nebyly v naší laboratoři používány.

Dále byly vytýčeny tyto konkrétní cíle pro tuto diplomovou práci:

Prvním cílem bylo zjistit vliv chronického podávání morfinu a abstinčního syndromu po jeho vysazení na míru neurogeneze v oblastech SVZ a SGZ v mozku potkana. Dále jsem se snažila zmapovat míru, se kterou je ovlivněna maturace neuronálních buněk ve stádiu 3. typu, tedy DCX⁺ buňky.

Druhým cílem bylo zjistit, zda chronické podávání morfinu, případně abstinence po jeho vysazení, způsobují neurodegeneraci mozkových buněk v oblastech, které jsou ovlivněny chronickým podáváním návykových látek. Dále pak zjistit, ve kterých populacích neuronálních buněk je degenerace způsobena.

Třetím dílčím cílem bylo vyhodnotit, zda jsou některé vybrané peptidy, u kterých je známé jejich zapojení do procesů souvisejících se závislostí, jako je abstinence či senzitivace, ovlivněny u potkanů vystavených našemu experimentálnímu designu.

3. Metodika

3.1. Chemikálie

Heparin (Zentiva), Thiopental (VAUB Pharma), DAB – 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochlorid (Sigma), Triton-X (Sigma), DPX Mountant for histology (SIGMA), Prolong Gold Antifade reagent with DAPI (TermoFisher), 96% ethanol (Penta), xylén (Penta), peroxid vodíku 30% (Penta), HCl (Penta), Cryomount (Bamed), Fluoro-Jade C (Millipore), paraformaldehyd (Serva), sacharóza (Serva), octová kyselina (Penta), BSA (Sigma-Aldrich).

Primární protilátky – BrdU (5292, Cell Signaling), Cholecystokinin-8 (37274, Abcam), Neuropeptid Y (180809, Abcam), DCX (PA5-19559, TermoFisher), NeuN (MAB377, Santa Cruz).

Sekundární protilátky – Alexa-Fluor 488 goat anti-rabbit (A11034, TermoFisher), Alexa-Fluor 594 donkey-anti rabbit (A21207, TermoFisher), Alexa-Fluor 594 donkey_anti mouse (R37115, TermoFisher).

3.2. Roztoky

PBS – fosfátový pufr – byl připravován z destilované vody. Na 1 litr roztoku bylo naváženo: 8,05g NaCl, 0,2 g KCl, 2,9 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O a 0,2g KH₂PO₄. Po rozpuštění látek bylo pH roztoku upraveno na pH = 7,4 a to pomocí koncentrovaných roztoků HCl či NaOH.

0,9% NaCl - fyziologický roztok - připravován z destilované vody. Na 1 litr roztoku bylo naváženo 9 g NaCl.

Přípravy dalších roztoků jsou popsány u jednotlivých metodických postupů.

3.3. Zvířata

K pokusům byly použity samice potkanů kmene Long-Evans staré 3 měsíce (Velaz, a.s.). Zvířata byla v kotcích po dvou, k potravě, již byla standardní krmná směs, a pitné vodě měla přístup ad libitum. Použit byl světelný režim 12:12 a zvířata byla ustájena při teplotě ~ 22 °C.

3.4. Experimentální design

Zvířata byla rozdělena do tří skupin. První a 2. skupině (n = 3) byl intraperitoneálně aplikován každý den morfin v dávce 10 mg/kg a to po dobu 16 dní. Třetí skupina (n = 4) sloužila jako kontrolní skupina. 1. skupina a dvě zvířata z kontrolní skupiny byly usmrcena následující den po ukončení administrace morfinu. 2. skupina a zbylá dvě zvířata z kontrolní skupiny byla usmrcena 8. den po ukončení aplikace morfinu. 1,5 dne před usmrcením byla zvířatům podána injekce (i.p.) s roztokem BrdU (viz níže).

3.4.1. Roztoky

Morfin – Morfin byl podáván v dávce 10 mg/kg ve fyziologickém roztoku. Morfin sulfát, byl rozpuštěn v roztoku 0,9% NaCl. Roztok byl před podáním zvířatům sterilně přefiltrován do sterilních eppendorfek.

BrdU – BrdU byl podán v dávce 50 mg/kg. 100 mg BrdU bylo rozpuštěno ve 2 ml 0,9% NaCl. Zvířatům byla podána 400 µl sterilního roztoku.

3.5. Odběr tkáně a příprava volně plovoucích řezů

3.5.1. Roztoky

PFA – 4% roztok paraformaldehydu - 80g práškového paraformaldehydu bylo rozpuštěno v 1 l PBS za stálého míchání a ohřívání na 60°C dokud nebyl roztok čirý, následně byl roztok po zchlazení naředěn do objemu 2 l a přefiltrován.

20% sacharóza - ve 100 ml PBS bylo rozmícháno 20 g sacharózy.

3.5.2. Postup práce

Zvířata byla přivedena do hluboké anestézie podáním intraperitoneální injekce thiopentalu. Po několika minutách se přikročilo k intrakardiální perfúzi. Zvířeti byl otevřen hrudní koš a do srdce aplikován heparin. Poté bylo zvíře perfundováno cca 3-5 min roztokem PBS a následně další cca 3-5 min roztokem 4% paraformaldehydu. Následně byla provedena dekapitace, vyjmutí mozku a jeho inkubace v 4% paraformaldehydu cca 24 hodin a dále inkubace ve 20% sacharóze po zhruba 36 hodin. Tkáň byla ze sacharózy umístěna do suchého ledu a následně uložena v mrazáku při -76°C. Mozková tkáň byla krájena pomocí přístroje Cryocut Leica CM 1850 při -23°C na 30 µm řezy, které byly následně uloženy v roztoku PBS v lednici při 4°C až do následného zpracování.

3.6. Imunohistochemie

3.6.1. Roztoky

Citrátový pufr – Nejprve bylo připraveno 100 ml roztoku rozpuštěním 2,1 g monohydrátu kyseliny citrónové. Druhý roztok byl připraven z 2,9 g kys. citrónové do stejného objemu. Poté bylo smícháno 11,5 ml prvního roztoku s 88,5 ml druhého roztoku tak, aby výsledné Ph bylo 6,0.

2 M HCl – roztok 2 M HCl byl připraven ze zásobního roztoku 35% kyseliny chlorovodíkové. Na 100 ml roztoku bylo použito 17,5 ml zásobního roztoku kyseliny.

0,5% H₂O₂ - byl připraven ze zásobního roztoku 30% peroxidu vodíku. Na 100 ml bylo použito 1,66 ml zásobního roztoku.

Blokovací roztok - 1% BSA, 0,3% TX-100, 2% sérum. Tento roztok byl připraven ze 100 ml PBS, 1g BSA (boviní sérový albumin), 300 µl Tritonu-X-100. Následně bylo odebráno požadované množství roztoku na inkubaci a byl připraven 2% roztok séra z příslušného kitu. Například na přípravu 1 ml blokovacího roztoku bylo použito 20 µl séra.

3.6.2. Další chemikálie

Kity - sérum, sekundární biotinylovaná protilátka a AB komplex byly vždy použity z kitu příslušného zvířete, ze kterého byla získána primární protilátka. Použity byly kity „Vectastain ABC kit“ rabbit (PK-6101) a mouse (PK-6102).

Protilátky - primární protilátky byly ředěny v roztoku 1% BSA a 0,3% Tritonu X-100 (viz výše přípravu blokovacího roztoku) vždy na objem 300 µl na jednu jamku. Ředění protilátek bylo následující – BrdU 1:100, CCK 1:1000, NpY 1:200.

0,3% BSA - tento roztok byl připraven naředěním roztoku 1% BSA s 0,3% Tritonem X-100. Byly použity 3 díly tohoto roztoku a 7 dílů PBS (na přípravu 100 ml bylo 30 ml roztoku smícháno se 70 ml PBS).

3.6.3. Postup práce

Volně plovoucí řezy byly umístěny do jamek speciální platformy po maximálně čtyřech řezech, následně byly v průběhu inkubací přendávány štětcem mezi jednotlivými inkubačními jamkami. Řezy byly inkubovány nejprve s citrátovým pufrům při 95°C po 5 minut a poté 30 min při pokojové teplotě. Následovalo promytí 2x v PBS každé po 5 minut. Dále proběhla (pouze u barvení na BrdU) inkubace s 2M HCl následovaná promytím PBS (2x 5 minut). Řezy byly poté inkubovány po 10 minut s 0,5 % roztokem H₂O₂ a promyty v PBS (3x 5 min). Následovala inkubace s blokovacím roztokem po jednu hodinu a poté přesunutí řezů přímo do příslušně naředěných primárních protilátek v 1 % BSA a jejich inkubace přes noc (minimálně však 16 hodin) při 4°C. Po vyjmutí z protilátek byly řezy promyty v 0,3 % BSA (2x 5 min) a následně proběhla inkubace se 2° protilátkami při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Po oplachu v 0,3 % BSA (2x 5 min) následovala inkubace s AB komplexem, taktéž při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Následně byly řezy promyty 1x v 0,3 % BSA a poté 2x v PBS vždy po 5 minut. Řezy byly následně obarveny za použití DAB a poté promyty 2x v PBS (vždy 5 minut). Řezy byly nataženy na želatinovaná sklíčka a ponechány na vzduchu přes noc, aby proschly. Další den byla sklíčka dehydratována a pročištěna v kyvetách s řadou alkoholů (70%, 96%, 96%; 3 minuty v každé kyvetě) a xylénem (3x 3minuty). Sklíčka byla zamontována pomocí DPX a před mikroskopováním na světelném mikroskopu Olympus Provis ponechána alespoň dva dny k uschnutí a poté očištěna od přebytečného média.

3.7. Imunofluorescence

3.7.1. Roztoky

Roztoky byly používány stejné jako v případě imunohistochemického barvení (oddíl 3.6.)

3.7.2. Další chemikálie

Protilátky – Primární protilátky byly ředěny následovně: DCX 1:770, NeuN 1:750. Sekundární protilátky byly ředěny 1:600 s výjimkou Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse, kde byly použity dvě kapky protilátky na ml média.

3.7.3. Postup práce

Volně plovoucí řezy byly po promytí v roztoku PBS (2 x 5minut) inkubovány v blokovacím roztoku totožném jako u imunohistochemického barvení, inkubace probíhala při pokojové teplotě jednu hodinu. Sérum do tohoto roztoku bylo vybráno vždy podle příslušného zvířete, ze kterého byla připravena daná sekundární protilátka (např. oslí sérum, pokud byla vybrána oslí 2° protilátka). Poté byly řezy hned přesunuty do příslušné primární protilátky v 1 % BSA a proběhla inkubace přes noc při 4°C. Druhý den byly řezy promyty PBS (2x 5 minut) a ve tmě inkubovány s příslušnými 2° protilátkami po dobu 30 (594 donkey anti-mouse) případně 60 minut (Alexa Fluor 488 goat-anti rabbit, Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit). Následoval oplach řezů 2x (Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse) či 3x (Alexa Fluor 488 goat-anti rabbit, Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit) v PBS (každý po 5 minut). Natahování řezů na sklíčka proběhlo za tlumeného světla stejně jako následné montování médiem Prolong Gold. Řezy byly po zaschnutí mikroskopovány na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2.

3.8. Barvení Fluoro-Jade C

3.8.1. Roztoky

0,1 % kyselina octová – 101 µl 99% kyseliny octové bylo smícháno s 99,9 ml PBS.

FJC – pracovní roztok byl vždy namíchán maximálně 2 hodiny před použitím ze zásobního 0,01 % roztoku FJC skladovaného ve tmě při 4°C. 3 ml zásobního roztoku byly rozmíchány v 97 ml 0,1 % roztoku octové kyseliny.

3.8.2. Postup práce

Volně plovoucí řezy byly nejprve imunofluorescenčně označeny příslušnou protilátkou podle návodu na imunofluorescenční barvení (oddíl 3.7.) a poté byly řezy nataženy na želatinové sklíčko z roztoku PBS při tlumeném světle a ponechány na vzduchu přes noc (ve tmě), aby uschnuly. Následně byly řezy rehydratovány v PBS (2 minuty) a barveny 0,0003 % roztokem FJC v 0,1 % roztoku kyseliny

octové v PBS po 10 minut při tlumeném světle. Následně byly řezy propláchnuty 3x 1 minutu v PBS. Sklíčka byla následně sušena na vzduchu po dobu 1-2 hodin a pročištěny v xylénu po dobu alespoň 3 minut. Skla byla následně zamontována pomocí DPX a ponechána k usušení ve tmě nejméně po dva dny před mikroskopováním.

3.9. Analýza dat

Po nafocení řezů na příslušných mikroskopech (viz výše) byly fotografie příslušných mozkových oblastí vyhodnocovány v softwaru FIJI. Standardně byly všechny oblasti nafoceny na 3 různých řezech u každého zvířete. Imunohistochemické barvení bylo vyhodnocováno okometricky, počítáním jednotlivých buněk v definovaných oblastech. Barvení FJC bylo vyhodnocováno pomocí analýzy signálu v softwaru FIJI a také okometricky. Ostatní fluorescenční barvení (počet DCX+ buněk a kolokalizace DCX/NeuN) bylo vyhodnocováno pouze okometricky.

3.10. Statistické vyhodnocení výsledků

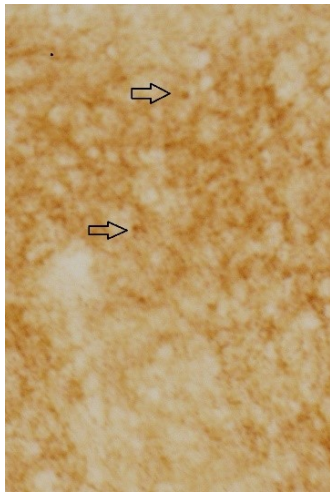
Analýza výsledků byla provedena v programu GraphPad pomocí jednocestné analýzy variance ANOVA (one-way ANOVA). Za signifikantní výsledek byla považována hodnota statistické významnosti $P < 0,05$.

4. Výsledky

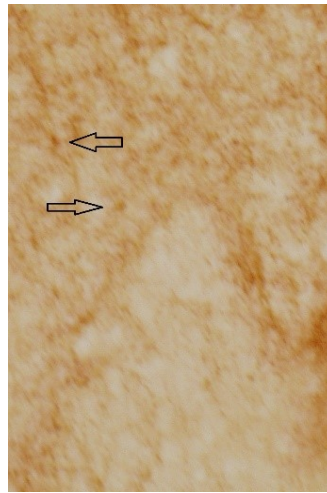
Sledování změn vybraných markerů jsme prováděli v několika oblastech mozku, které se vztahují k působení morfinu. První analyzovanou strukturou je nucleus accumbens. Sledovali jsme změny v obou jejích částech – jádře (core) i slupce (shell). Další strukturou je hipokampus, konkrétně část gyrus dentatus (DG) (viz obrázek č. 4). Třetí strukturou, na kterou jsme se zaměřili je amygdala, respektive její dvě části, centrální (CA) a bazolaterální (BLA).

4.1. Cholecystokinin

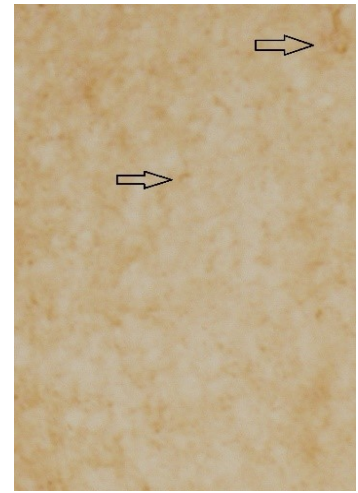
Imunohistochemickým barvením jsme se snažili zjistit, zda dochází ke změnám exprese cholecystokininu vlivem morfinu a jeho vysazení v porovnání s kontrolními zvířaty. V nucleus accumbens měla být exprese této protilátky sledována v oblasti jádra i slupky. V oblasti jádra (cNAc) nicméně nebyl zaznamenán žádný signál u žádné z experimentálních skupin, proto jsou zde uváděna pouze data ze slupky (sNAc) (obrázek č. 7a-c). V této okrajové části NAc je vidět trend směrem ke snížení exprese CCK⁺ buněk ve skupině M (morfinové) o 60 % a ještě patrnější je pokles po vysazení morfinu (pokles o 85 %) (Graf. 1a). Další oblastí, ve které jsme zkoumali počet buněk pozitivních na tento marker, je gyrus dentatus (DG) hipokampu (obrázek 7d-f). Zde nebyla u morfinové skupiny prokázána žádná změna oproti kontrolní skupině a u skupiny zvířat s abstinenčním syndromem byl viditelný jen minimální vzestup (asi o 20 %) (Graf 1b). Další hodnocení signálu bylo provedeno v basolaterální amygdale (BLA) (obrázek 7g-i) a centrální amygdale (CA). Výsledky poukázaly na stejný trend v obou podoblastech; u kontrolních zvířat byla zaznamenána nejnižší hodnota (počet pozitivních buněk), u morfinové skupiny byly zaznamenány nejvyšší hodnoty (BLA: nárůst o 153%, CA: nárůst o 150%) a u abstinujících zvířat nárůst oproti kontrolním zvířatům (BLA: nárůst o 77%, CA: nárůst o 46%), ale hodnoty byly nižší než při chronickém podávání morfinu (Graf 1c, 1d).



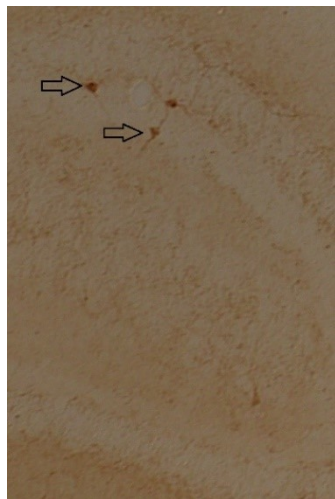
a)



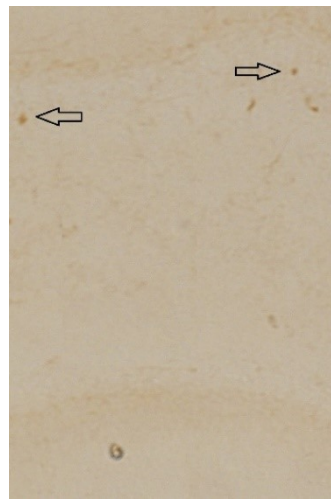
b)



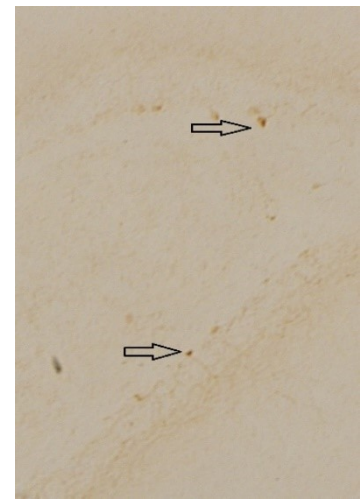
c)



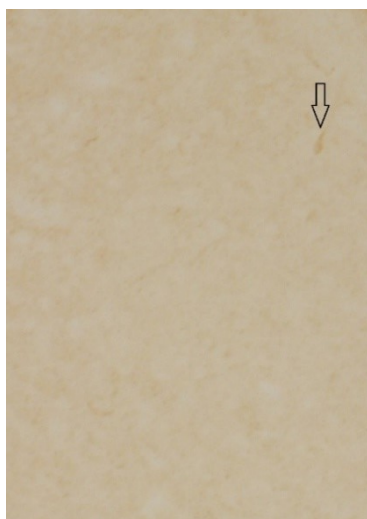
d)



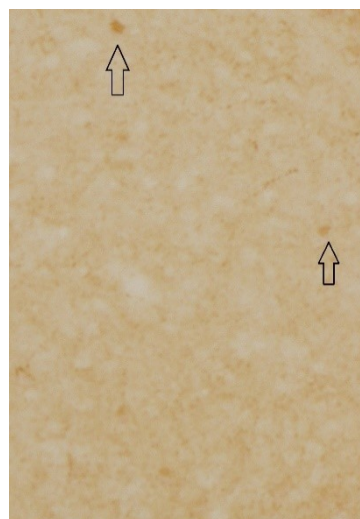
e)



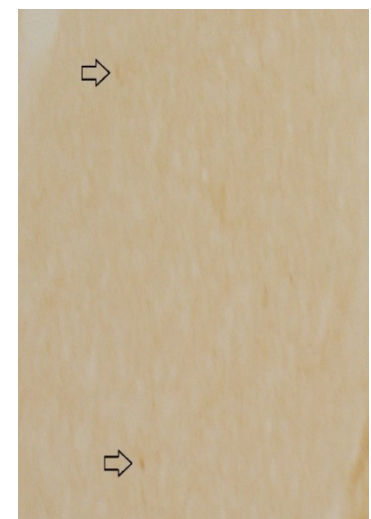
f)



g)

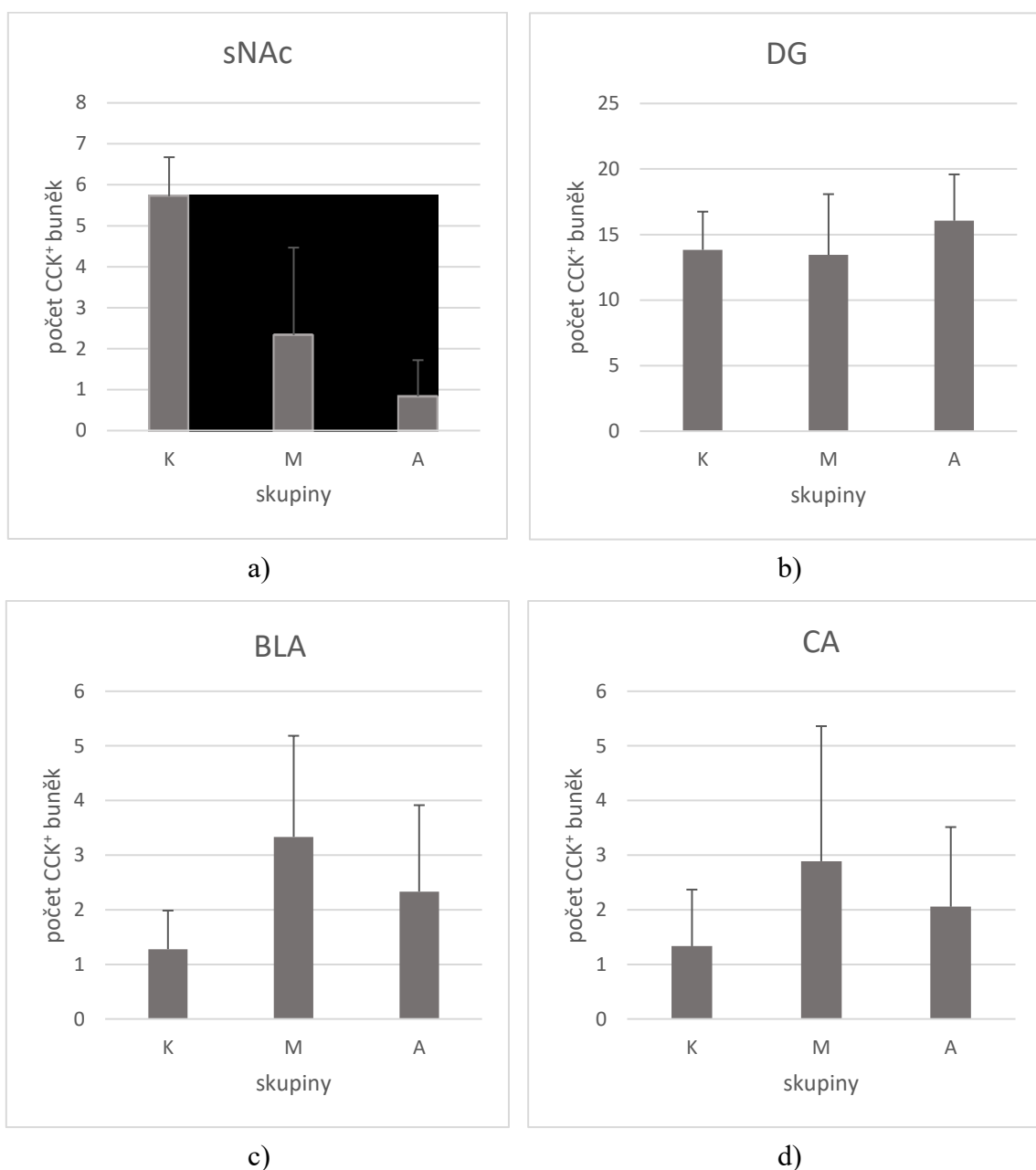


h)



i)

Obr. č. 7 Fotografie znázorňující distribuci CCK⁺ buněk v různých částech CNS. a-c) CCK⁺ buňky ve slupce nucleus accumbens (NAc) u kontrolní skupiny (a), u skupiny s podáváním chronického morfinu (b) a u skupiny po vysazení morfinu (c), d-f) CCK⁺ buňky v gyrus dentatus (DG) hipokampu u kontrolní skupiny (d), u skupiny s podáváním chronického morfinu (e) a u skupiny po vysazení morfinu (f), g-i) CCK⁺ buňky v basolaterální amgdale (BLA) u kontrolní skupiny (g), u skupiny s podáváním chronického morfinu (h) a u skupiny po vysazení morfinu (i). Zvětšení 100x.

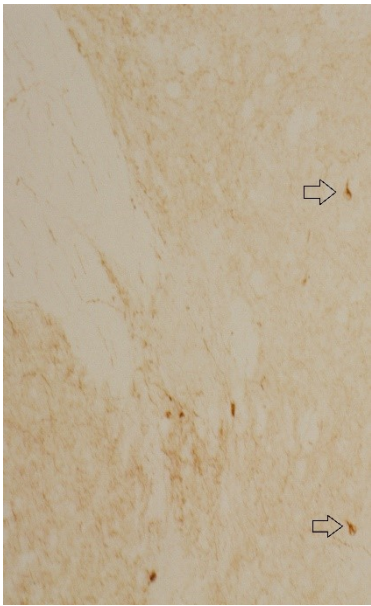


Graf 1 Množství CCK⁺ buněk v různých částech CNS. Zobrazeny jsou výsledky u tří skupin: K - kontrolní skupina, M - chronicky podávaný morfin, A - abstinční syndrom po chronickém podávání morfinu. a) počet CCK⁺ buněk ve slupce nucleus accumbens (sNAc), b) počet CCK⁺ buněk v gyrus dentatus (DG) hipokampu c) počet CCK⁺ buněk v

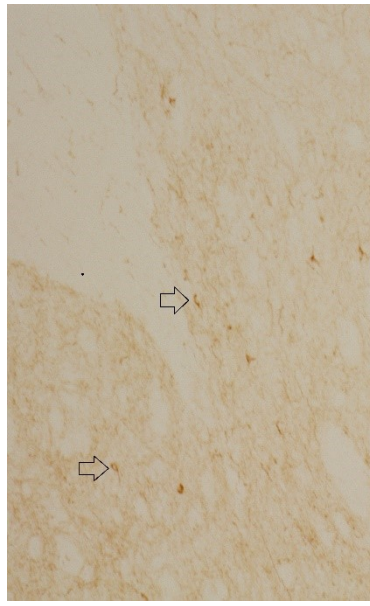
basolaterální amgdale (BLA), d) počet CCK⁺ buněk v centrální amygdale (CA). Zobrazen je celkový počet CCK⁺ (cholecystokinin pozitivních) buněk ve výseku dané struktury \pm SD. Analýza dat provedena pomocí jednocestné ANOVA analýzy. Data byla zpracována z triplikátu řezů každého zvířete ve skupině (n = 3).

4.2. Neuropeptid Y

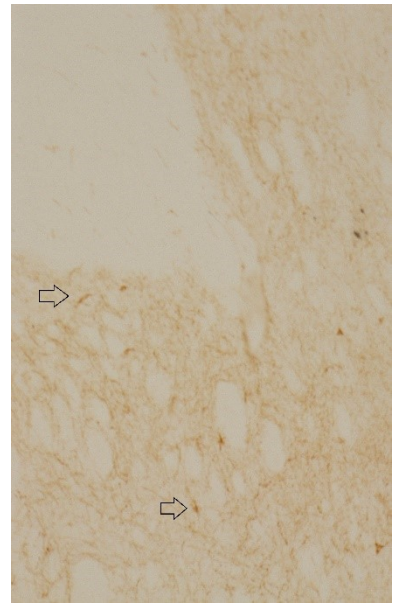
Při imunohistochemickém barvení touto protilátkou naše výsledky ukázaly, že na rozdíl od CCK, byl v oblasti jádra NAc patrný signál (obrázek č. 8a-c). Zde byl oproti kontrolní skupině zaznamenán nárůst (o 43 %) u zvířat vystavených morfinu na rozdíl od skupiny po vysazení této drogy, kde rozdíl nebyl patrný (Graf 2a). Zdá se, že ve slupce je exprese NpY ovlivněna stejným způsobem jako v jádře této struktury. Nicméně vůči kontrolní skupině byla změna morfinové skupiny méně významná (nárůst o 21 %) (Graf 2b). V oblasti gyru dentatu byl zdokumentován pokles NpY⁺ buněk u morfinové skupiny (o 22 % vůči kontrole) oproti dalším dvěma skupinám (Graf 2c) (obrázek č. 8d-f). v BLA byla po poklesu vyvolaném působením chronického morfinu (pokles o 31 %) patrná tendence k návratu na normální hladinu po vysazení této drogy (pokles o 17% oproti kontrole) (Graf 2d) (obrázek č. 8g-i). V centrální amygdale potom došlo u obou skupin vystavených morfinu k poklesu exprese neuropeptidu téměř na polovinu (obě skupiny pokles o 45 %) (Graf 2e).



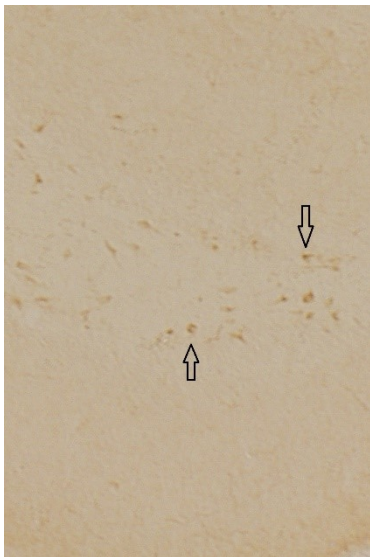
a)



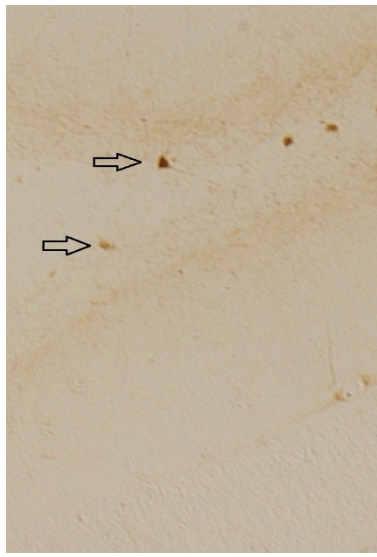
b)



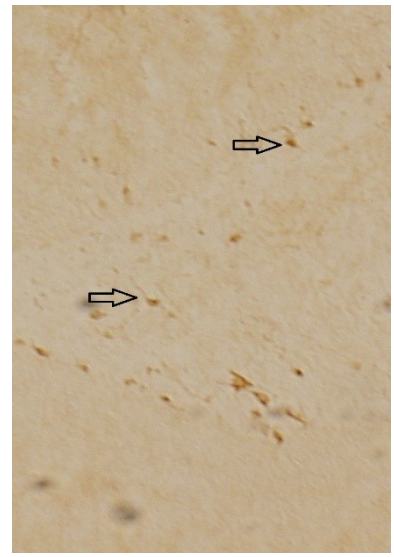
c)



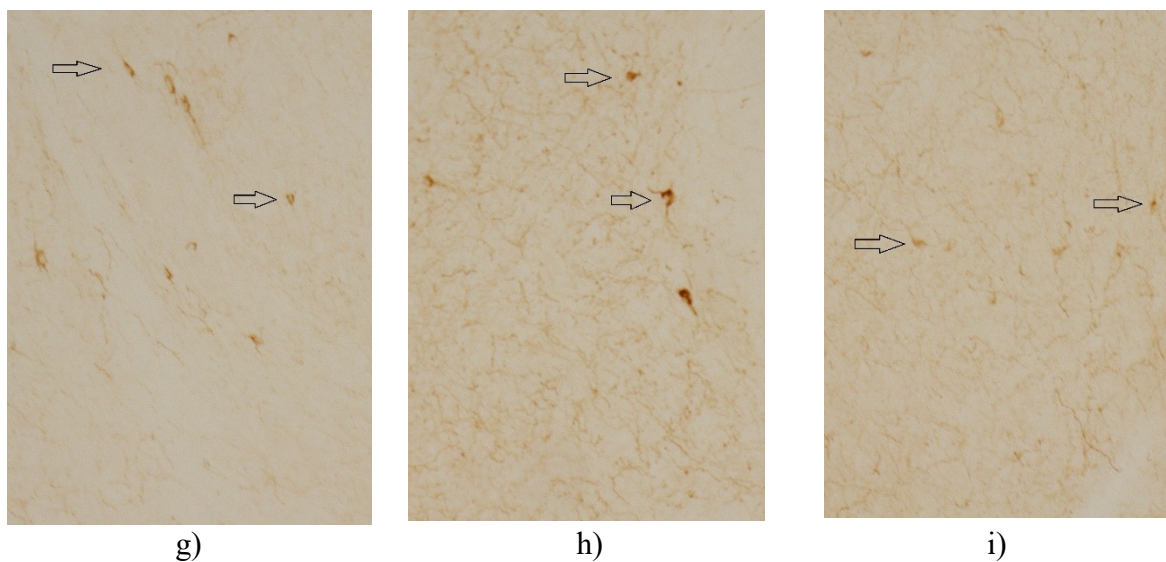
d)



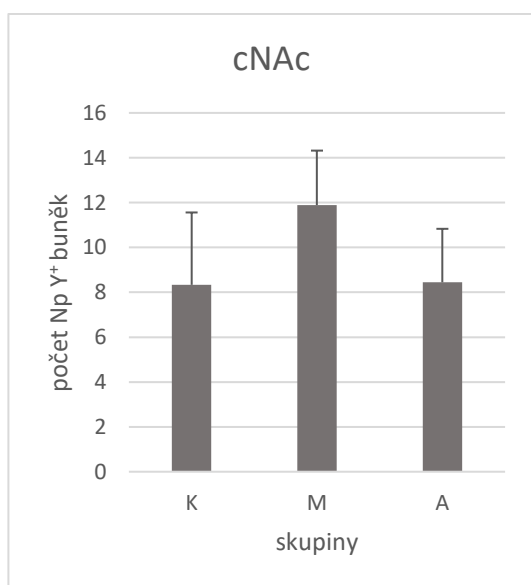
e)



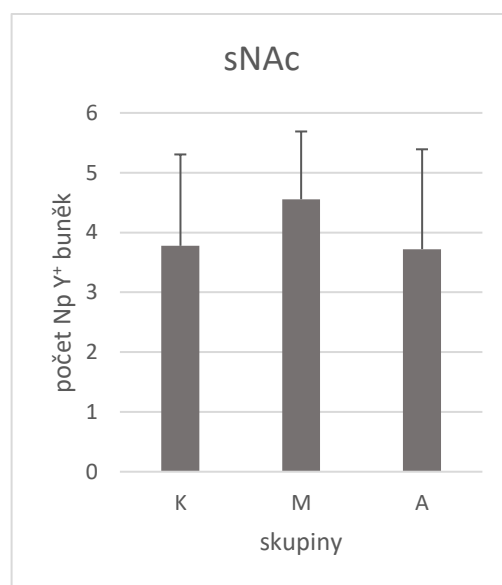
f)



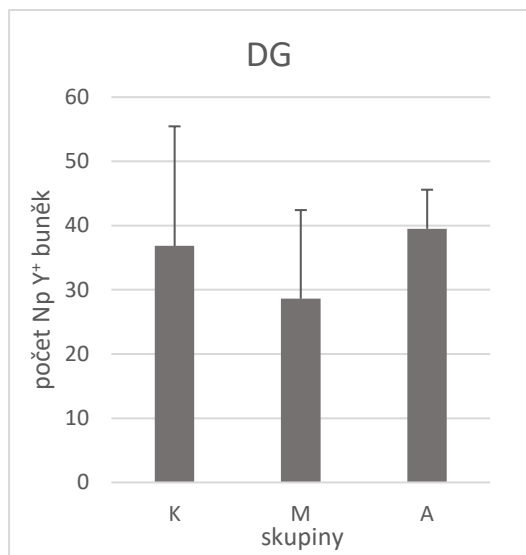
Obr. č. 8 Fotografie znázorňující distribuci NpY⁺ buněk v různých částech CNS. a-c) NpY⁺ buňky v jádře nucleus accumbens (NAc) u kontrolní skupiny (a), u skupiny s podáváním chronického morfinu (b) a u skupiny po vysazení morfinu (c), d-f) NpY⁺ buňky v gyrus dentatus (DG) hipokampu u kontrolní skupiny (d), u skupiny s podáváním chronického morfinu (e) a u skupiny po vysazení morfinu (f), g-i) NpY⁺ buňky v basolaterální amygdale (BLA) u kontrolní skupiny (g), u skupiny s podáváním chronického morfinu (h) a u skupiny po vysazení morfinu (i). Zvětšení 100x.



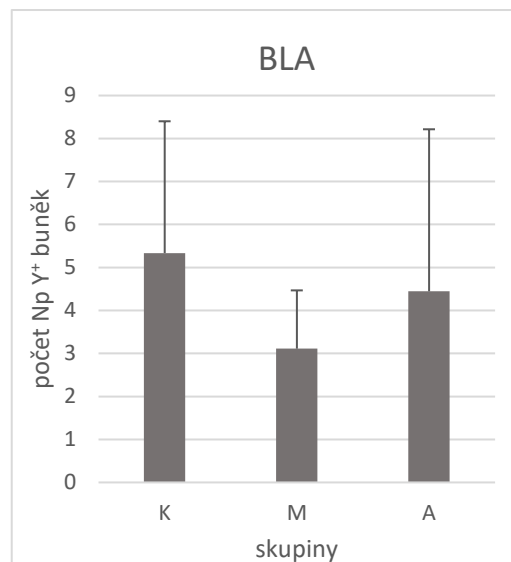
a)



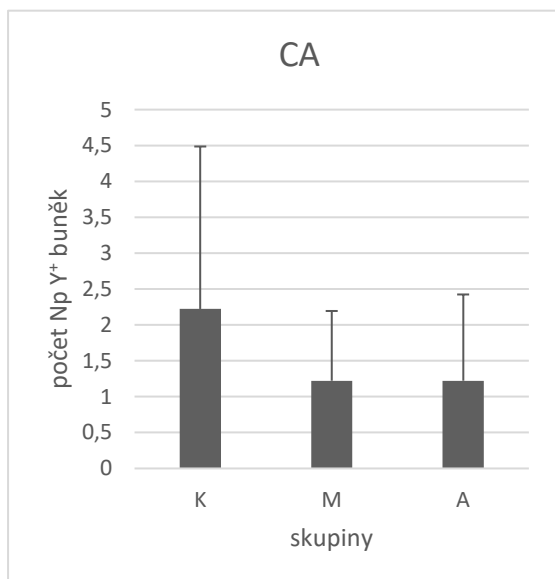
b)



c)



d)



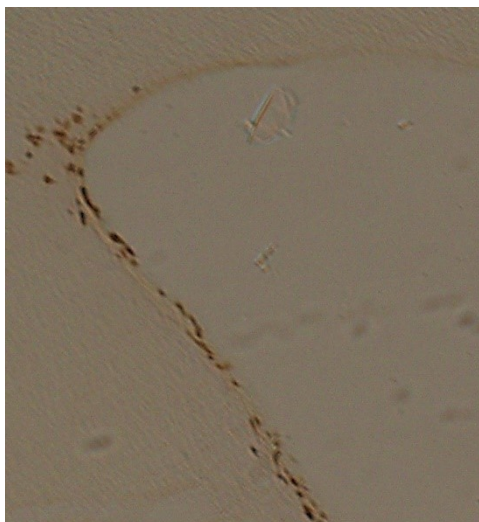
e)

Grafy 2 Množství NpY⁺ buněk v různých částech CNS. Zobrazeny výsledky u tří skupin: K - kontrolní skupina, M - chronicky podávaný morfin, A - abstinenci syndrom po chronickém podávání morfinu. a) počet NpY⁺ buněk v jádře nucleus accumbens (cNAc), b) počet NpY⁺ buněk ve slupce nucleus accumbens (sNAc), c) počet NpY⁺ buněk v gyrus dentatus (DG) hipokampu, d) počet NpY⁺ buněk v basolaterální amgdale (BLA), e) počet NpY⁺ buněk v centrální amygdale (CA). Zobrazen je celkový počet NpY⁺ (neuropeptid pozitivních) buněk ve výseku dané struktury \pm SD. Analýza dat provedena pomocí jednocestné ANOVA analýzy. Data byla zpracována z triplikátu řezů každého zvířete ve skupině (n = 3).

4.3. Bromodeoxyuridin

Bromodeoxyuridin je ve výzkumu široce používaným markerem buněčného dělení (Arguello et al., 2008; Rosa-Prieto et al., 2010). Konkrétně se váže na buňky v S-fázi buněčného cyklu, sleduje tedy syntézu DNA (Taupin, 2007). My jsme expresi této látky zkoumali v hlavních oblastech buněčného dělení v dospělém mozku – SVZ a SGZ (viz kapitola 1.2.1.). Detekovatelný signál se nacházel téměř výhradně v oblasti SVZ laterálních komor (obrázek č. 9). V SGZ jsme, kromě několika málo řezů, nenalezli žádný signál. Na těchto několika preparátech, kde k obarvení došlo, bylo pouze několik BrdU⁺ buněk. Laterálních komorách byl oproti tomu signál dobře patrný. Neurogeneze probíhá v neurogenních oblastech v tzv. hotspotech, tedy v některých místech podstatně více než v jiných částech, (Fiorelli et al., 2015) Vzhledem k tomu jsme vyhodnocování prováděli na 4 řezech z každého zvířete tak, abychom dostali spolehlivější výsledky. Dospěli jsme k závěru, že nejvyšší míra neurogeneze byla přítomna u kontrolních zvířat (Graf 3). U obou skupin zvířat vystavených morfinu došlo k poklesu BrdU⁺ buněk (Graf 3). Ten byl méně výrazný při chronickém podávání morfinu (pokles o 18 %) a více se projevil při jeho vysazení (pokles o 32 %) (Graf 3).

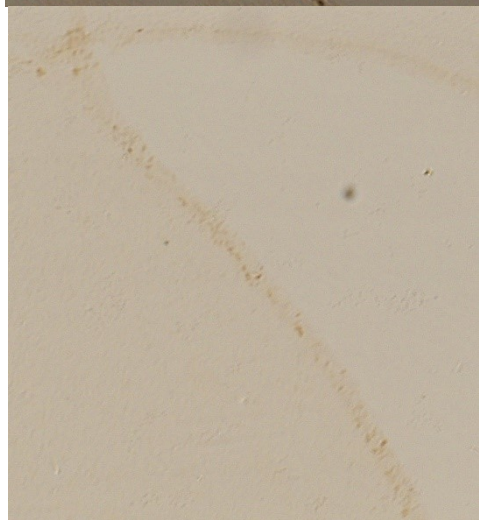
a)



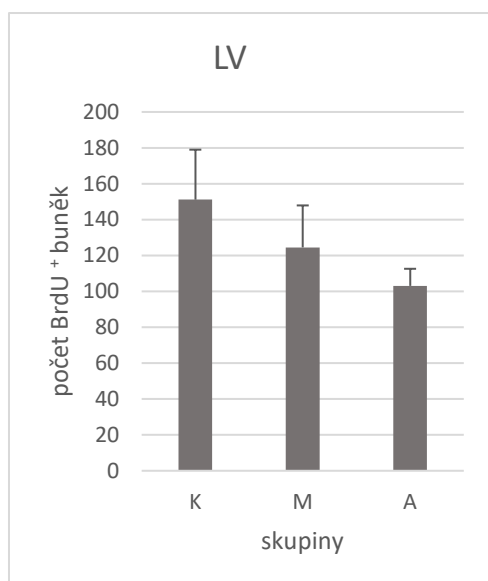
b)



c)



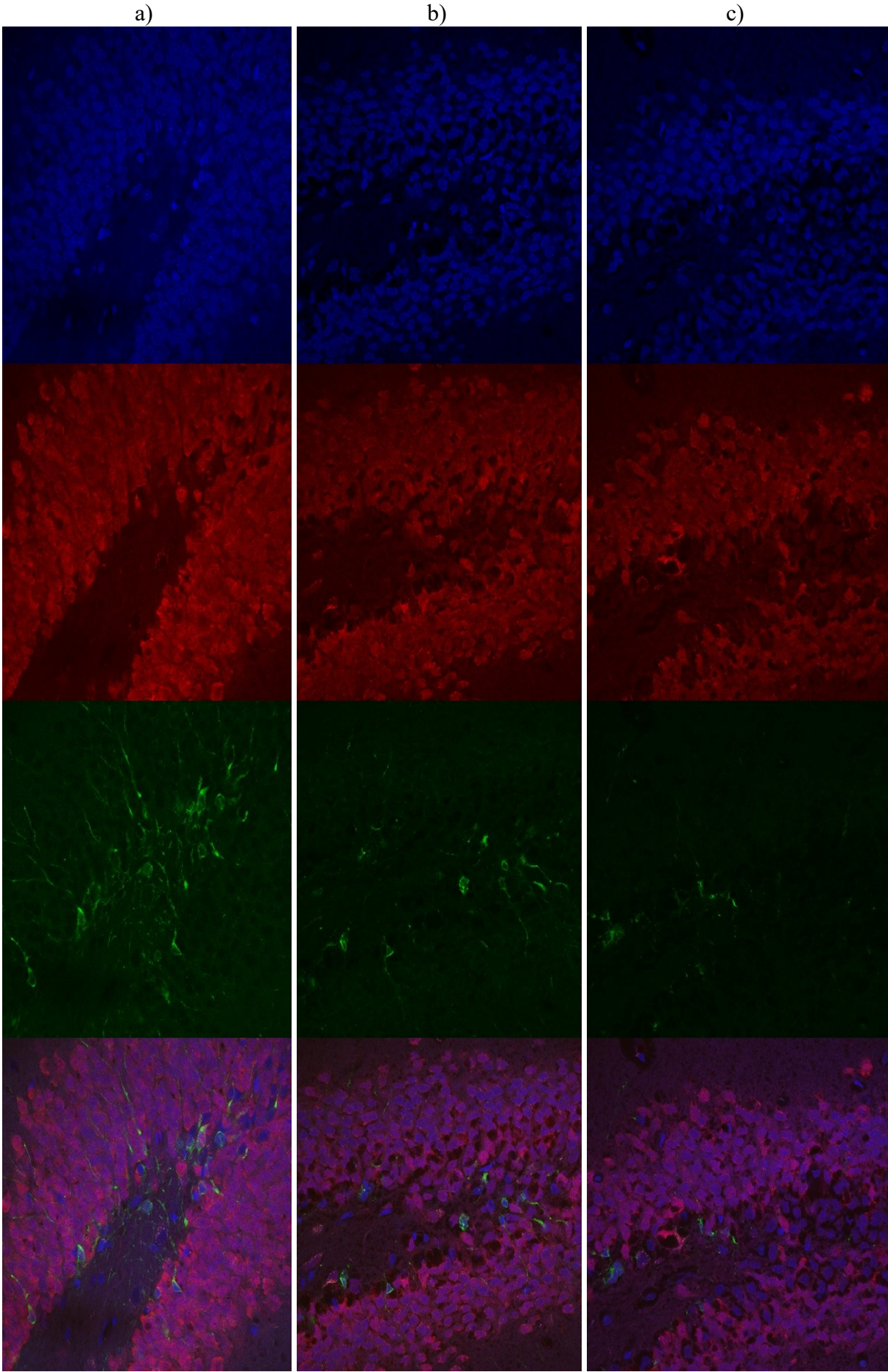
Obr. č. 9 Fotografie znázorňující distribuci signálu **BrdU⁺ buněk v laterálních komorách.** a) kontrolní skupina, b) skupina s podáváním chronického morfinu c) skupina po vysazení morfinu. Zvětšení 100x.



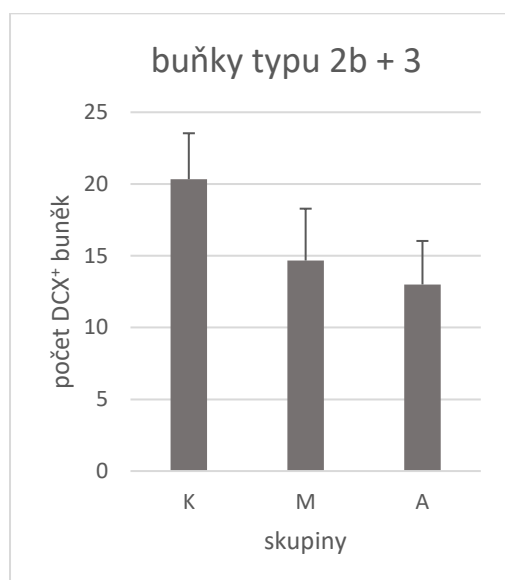
Graf 3 Množství BrdU⁺ buněk v laterálních komorách. Zobrazeny výsledky u tří skupin: K (kontrolní skupina), M (chronicky podávaný morfin), A (abstinenční syndrom po chronickém podávání morfinu). Kvantifikován je celkový počet BrdU⁺ (bromodeoxyuridin pozitivních) buněk v laterálních komorách (LV) \pm SD. Analýza dat provedena pomocí jednocestné ANOVA analýzy. Data byla zpracována ze čtyř řezů z každého zvířete ve skupině (n = 3).

4.4. Doublecortin

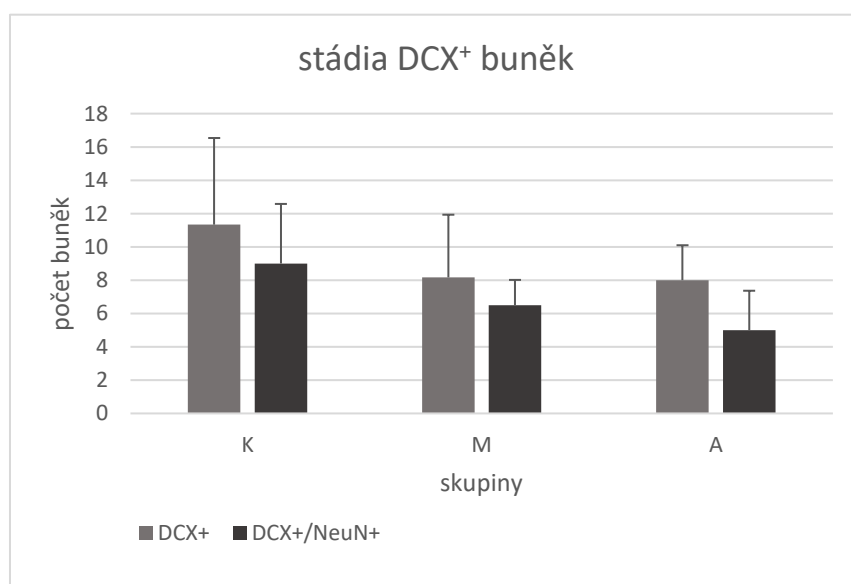
Při mapování ovlivnění maturujících neuronů jsme použili DCX, tedy marker využívající se k vizualizaci dozrávajících neuronálních buněk. Konkrétně jsme se zaměřili na neuronální typ 2-b a 3, tedy všechny buňky doublecortin pozitivní (DCX⁺) (viz obr. č. 6). Mladší stádia typu 2b a 3 jsou pozitivní na DCX, starší buňky (typ 3) pak exprimují kromě DCX ještě NeuN (neural nuclei). Signál NeuN je jaderný, zatímco DCX je cytoplasmatický, proto příliš nedochází k překryvu signálů v buňce (obrázek č. 10). Tento signál byl proto vyhodnocován pouze okometricky. Toto vyhodnocení jsme prováděli v SGZ, kde jsme předpokládali největší ovlivnění maturujících neuronů morfinem. Výsledkem byl zaznamenaný pokles celé populace typu 3 po vystavení morfinu. U chronicky podávaného morfinu byl vliv méně patrný (pokles o 28 %) než po jeho vysazení (pokles o 36 %) (Graf 4a). Dále jsme porovnali, jak je ovlivněn počet mladších a starších subtypů těchto buněk. Poměr stádií DCX⁺/DCX⁺-NeuN⁺ zřejmě nebyl příliš ovlivněn; u kontrol činil 1,25, u morfinové skupiny 1,26, zaznamenaný byl pouze mírný pokles u DCX⁺/NeuN⁺ buněk při vysazení morfinu; poměr 1,6 (Graf 4b).



Obr. č. 10 Fotografie znázorňující distribuci fluorescenčního signálu v gyru dentatu. Modrý kanál – signál všech buněčných jader (glie + neurony) (barvení DAPI), červený kanál – signál všech neuronálních jader (barvení NeuN), zelený kanál – signál maturujících neuronů (barvení DCX). Spodní obrázek vznikl složením signálů těchto kanálů. a) kontrolní skupina, b) skupina s podáváním chronického morfinu, c) skupina po vysazení morfinu. Zvětšení 630x.



a)

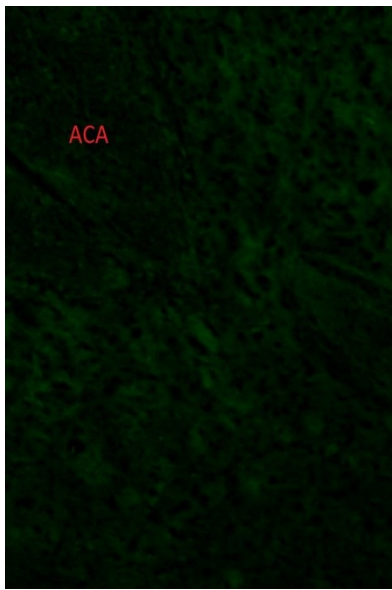


Grafy 4 Množství DCX⁺ buněk v gyru dentatu. Zobrazeny jsou výsledky u tří skupin: K - kontrolní skupina, M - chronicky podávaný morfin, A - abstinční syndrom. a) Všechny typy DCX⁺ buněk (stádia 2b a 3) v gyru dentatu, b) DCX⁺ a DCX⁺/NeuN⁺ buňky v gyru dentatu. Kvantifikován byl celkový počet DCX⁺ (a, b) a DCX⁺/NeuN⁺ (doublecortin,

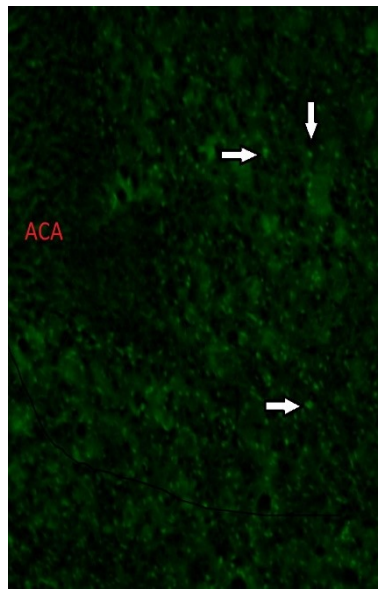
resp. neuronal nuclei pozitivních) buněk ve výseku gyru dentatu \pm SD. Analýza dat provedena pomocí jednocestné ANOVA analýzy. Data byla zpracována z triplikátu řezů každého zvířete ve skupině (skupina $n = 3$).

4.5. Fluoro-Jade C

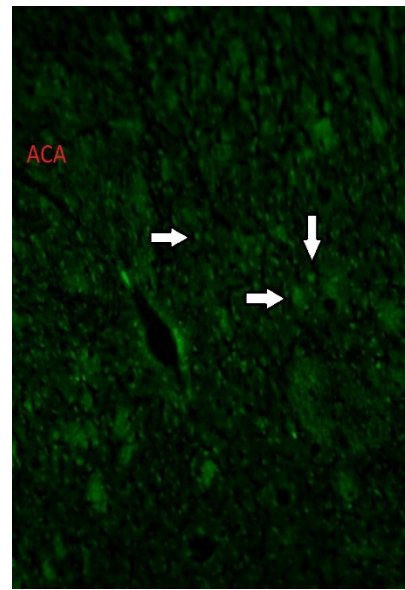
K obarvení degenerujících buněk jsme použili flurochrom Fluoro-Jade C (obrázek č. 11). Tento marker se používá v řadě studií a bylo prokázáno, že barví neurodegenerující buňky (Bian et al., 2007). Toto barvení jsme nemohli použít ke zjištění míry neurodegenerace v LV, neboť kromě degenerujících buněk barví tato látka i buňky choroideálního plexus. Signál případné degenerace v laterálních komorách není proto patrný. První strukturou, ve které jsme zjišťovali případný signál, byl NAc (obrázek č. 11a-c). Zaznamenali jsme výrazný nárůst, avšak s velkými odchylkami. Nejvíce FJC⁺ pozitivních buněk bylo nalezeno u morfinové skupiny (nárůst o 1150 %) oproti kontrole (Graf 5a). U skupiny po vysazení morfinu byl také zaznamenán nárůst (o 857%) oproti kontrolní skupině (Graf 5a). V oblasti gyru dentatu jsme zaznamenali nárůst u obou ovlivněných skupin (obrázek č. 11d-f). V morfinové skupině degenerace vzrostla o 110 % a u skupiny abstinující o 120%. Měření signálu v bazolaterální amygdale prokázalo nárůst o 80 % u morfinové skupiny, po vysazení ale nebyla žádná změna pozorována (Graf 5c) (obrázek č. 11g-i). Data z centrální amygdaly přinesla nepříliš reprezentativní výsledky: zaznamenána byla vysoká hladina degenerace u kontrolních zvířat, stejně jako u morfinové skupiny, téměř nulové postižení buněk pak bylo vidět u skupiny po vysazení morfinu (Graf 5d) (obrázek č. 11g-i).



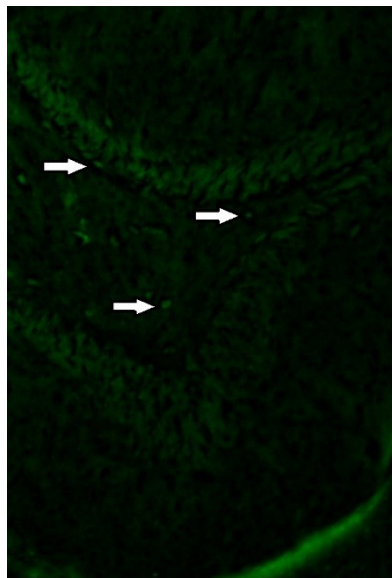
a)



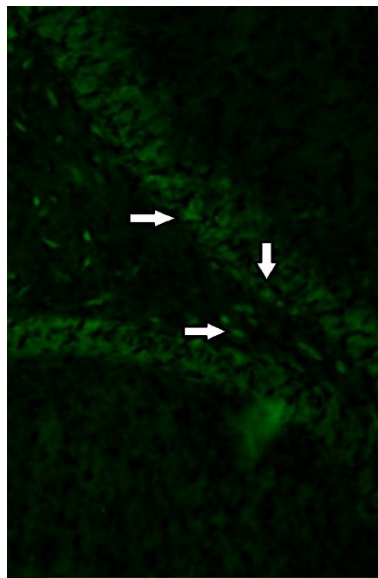
b)



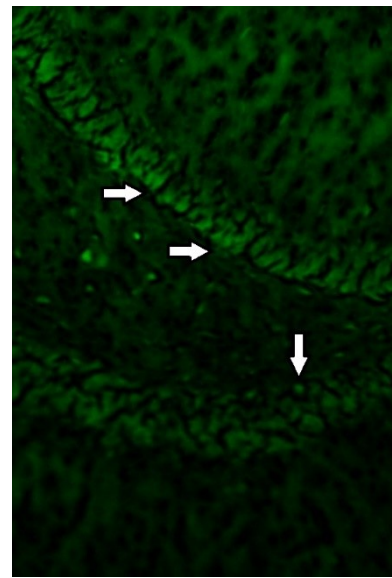
c)



d)

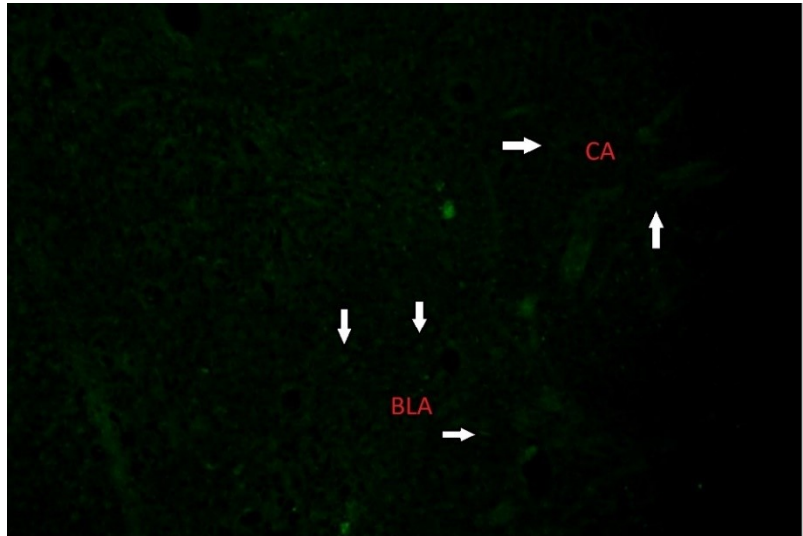


e)

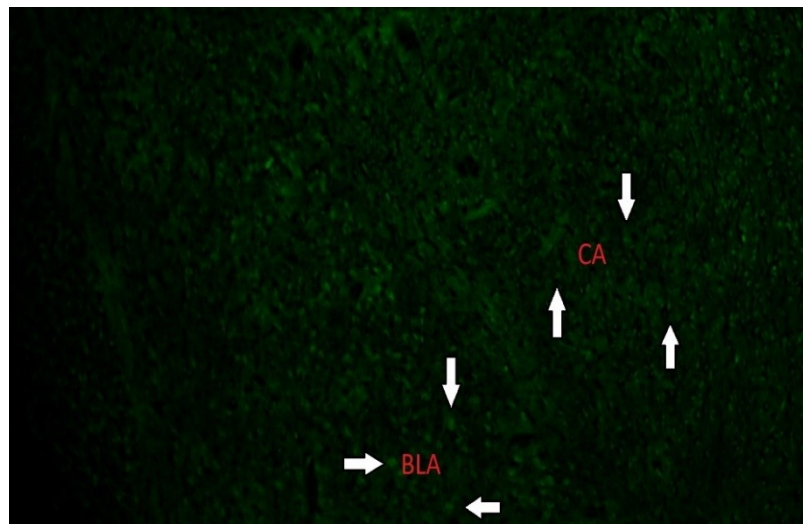


f)

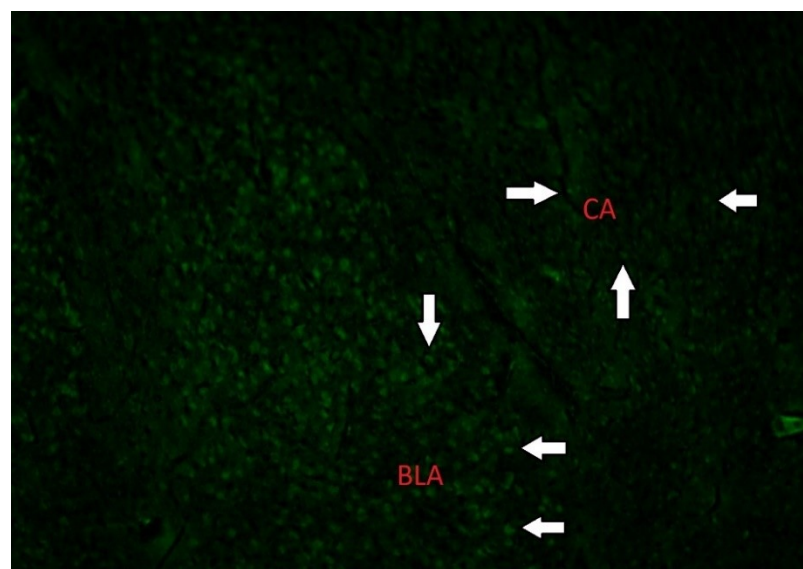
g)



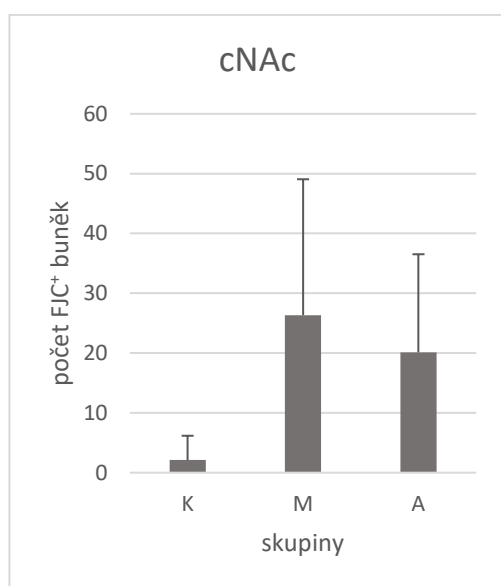
h)



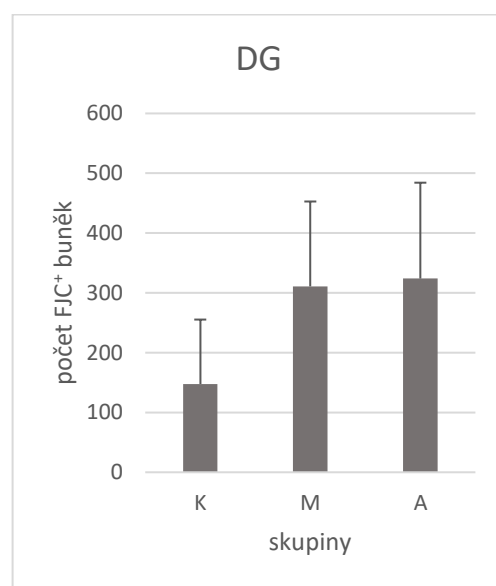
i)



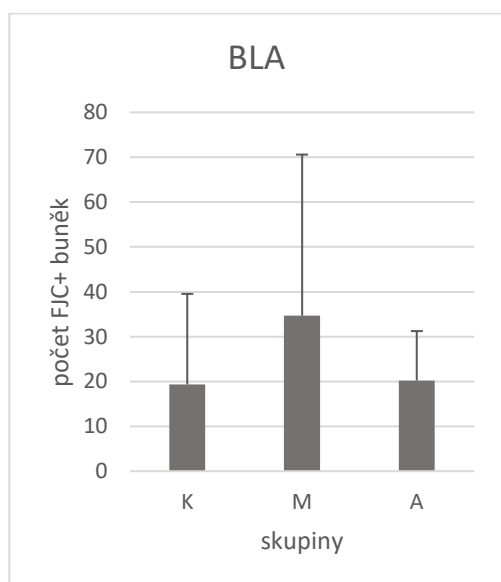
Obr. č. 11 Fotografie znázorňující distribuci FJC⁺ buněk v různých částech CNS. a-c) FJC⁺ buňky v jádře nucleus accumbens (cNAC) u kontrolní skupiny (a), u skupiny s podáváním chronického morfinu (b) a u skupiny po vysazení morfinu (c), d-f) FJC⁺ buňky v gyrus dentatus (DG) hipokampu u kontrolní skupiny (d), u skupiny s podáváním chronického morfinu (e) a u skupiny po vysazení morfinu (f), g-i) FJC⁺ buňky v basolaterální amygdale (BLA) a centrální amygdale (CA) u kontrolní skupiny (g), u skupiny s podáváním chronického morfinu (h) a u skupiny po vysazení morfinu (i). Zvětšení 100x.



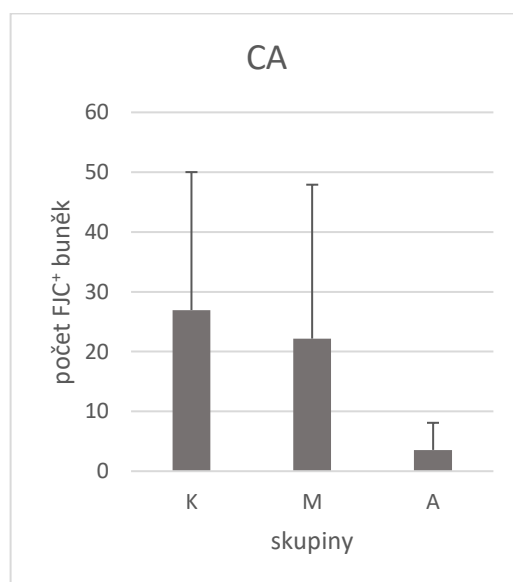
a)



b)



c)



d)

Grafy 5 Množství FJC⁺ buněk v různých částech CNS. Zobrazeny výsledky u tří skupin: K - kontrolní skupina, M - chronicky podávaný morfin, A - abstinenci syndrom po chronickém podávání morfinu. a) FJC⁺ buňky v jádře nucleus accumbens (NAc), b) FJC⁺ buňky v gyrus dentatus (DG) hipokampu, c) FJC⁺ buňky v basolaterální amgdale (BLA), d) FJC⁺ buňky v centrální amygdale (CA). Zobrazen je celkový počet FJC⁺ buněk ve výseku dané struktury \pm SD. Analýza dat provedena pomocí jednocestné ANOVA analýzy. Data byla zpracována z triplikátu řezů každého zvířete ve skupině (n = 3).

5. Diskuze

Tato práce je věnovaná studiu několika vybraných vlivů morfinu na CNS. Proto jsme navrhli experimentální schéma tak, aby se vhodně vztahovalo k těmto hodnoceným vlivům. Chronická aplikace morfinu byla prováděna po dobu 16 dní s relativně nízkou dávkou morfinu (10 mg/kg), protože takové schéma dobře simuluje závislost u pacientů, oproti studiím, kde jsou podávány vysoké dávky opiátu po krátkou dobu. Navíc podávání vysokých dávek drog po krátkou dobu často vede k nespecifickému vyvolání rozsáhlé degenerace buněk (Ellison, 2002). Tomu jsme se chtěli vyhnout, protože neurodegenerace byla jedním ze studovaných témat. Skupinu, které byl morfin po 16 dnech vysazen, jsme perfundovali po 8 dnech od vysazení. Tuto dobu jsme zvolili, protože po jednom týdnu je abstinenční syndrom již rozvinutý a příznaky jsou dobře měřitelné (Goeldner et al., 2011). Zároveň je to dostatečně dlouhá doba, aby se mohl projevit vliv morfinu na některé pomaleji ovlivnitelné děje (počet nově vzniklých buněk, alterace peptidergických systémů). Na vzniku závislosti i stavu po vysazení morfinu se podílí řada struktur (Xiao et al., 2009); my jsme se rozhodli zjišťovat změny vyvolané v NAc, hipokampu a amygdale, protože se domníváme, že tento výběr dobře reprezentuje některé kognitivní funkce pozměněné morfinem. Velice stručně se jedná o motivační chování (vznik závislosti), paměť a afektivitu.

Prvním cílem mé diplomové práce bylo zavedení a optimalizace použití nových protilátek, které doposud nebyly v naší laboratoři používány, pro fluorescenční a chromogenní imunohistochemické barvení. Konkrétně se jednalo o aplikaci protilátek CCK-8, Np Y, BrdU, DCX, NeuN a monitorován byl také fluorochrom Fluoro-Jade C (FJC). Tento cíl byl splněn; všechny zmíněné protilátky se podařilo při opakovaných pokusech vizualizovat a patřičně provedené kontroly potvrdily jejich specifitu. Látkou, u které by však ještě bylo vhodné zvážit další možnosti optimalizace postupu je FJC. U této látky se totiž nepodařilo odstranit poměrně vysokou intenzitu pozadí vůči obarveným buňkám. Také postup této techniky je poměrně drastický a u některých řezů zapříčiňuje poškození tkáně v okrajových částech řezů. V těchto místech je potom velice obtížné detekovat signál, neboť se v této poškozené části nachází řada mrtvých buněk, které FJC barví. Toto poničení řezů se úpravou laboratorního protokolu podařilo sice z velké části eliminovat, nicméně na některých řezech bylo stále patrné. Pro optimalizaci metody by tedy bylo potřebné provést další pokusy s tímto markerem.

Při statistickém vyhodnocení výsledků získaných z celého experimentu se bohužel nepodařilo zjistit signifikantní rozdíly mezi testovanými skupinami. Příčinou byl zřejmě omezený počet zvířat a malé množství odebraných vzorků použitých k vyhodnocování experimentu. Navíc ve většině zkoumaných oblastí byl počet buněk pozitivních na daný marker velice nízký, a proto rozdíly už v řádu jednotek buněk znamenaly značnou odchylku od průměru. Uvedené skutečnosti lze považovat za hlavní důvod toho, že často velmi výrazné rozdíly v průměrných hodnotách testovaných markerů po působení

morfinu nemohly být vyhodnoceny jako statisticky významné. Pro získání statisticky průkazných výsledků by bylo potřeba celý experiment provést s větším počtem zvířat v jednotlivých skupinách a analyzovat větší množství odebraných vzorků.

První sérií výsledků, které se pokusím diskutovat, jsou řezy obarvené protilátkou proti cholecystokininu (CCK). Předně je otázkou, do jaké míry lze výsledky studií s CCK interpretovat mezi sebou. U různých druhů potkanů (Fischer x Lewis) byly totiž prokázány odlišné hladiny receptorů pro CCK v oblasti NAc (Noble et al., 2011). Hladiny CCK se navíc mohou u zvířat podstatně lišit podle prostředí, ve kterém jsou chována. U potkanů byly v závislosti na prostředí prezentovány velké rozdíly (až o polovinu) v hladinách CCK v NAc (Lucas et al., 1998). Nicméně u výsledků některých studií dohledatelných v literatuře se popisuje nárůst CCK i jeho receptorů vlivem chronicky podávaného morfinu (Wen et al., 2012). Výsledky námi provedené práce naznačují, že nárůst se může objevit v obou měřených oblastech amygdaly, tedy v centrální a bazolaterální části (Grafy 1c,d). Centrální amygdala i bazolaterální amygdala je spolu se stria terminalis zodpovědná za vznik anxiety (Roberto et al., 2012). Cholecystokinin je schopen redukovat u potkanů úzkost vyvolanou chronickým podáváním morfinu během následné abstinence (Wen et al., 2014). Důvod zaznamenaného zvýšení CCK v této struktuře tedy zřejmě může souviset s rozvojem anxiózního chování u potkanů závislých či abstinujících a vlastní snahou NS tuto patologickou situaci potlačit. Naše výsledky dále ukazují nesignifikantní snížení hladiny v kůře nucleus accumbens (Graf. 1a). Pokles hladiny CCK v NAc byl v literatuře dáván do souvislosti s posilováním behaviorální odpovědi (*reinforcing*⁹) na podávání morfinu (Noble et al., 2011). Při dlouhodobém schématu podávání, jaké jsme použili, je zřejmě možné, aby se v organismu toto posílení vyvinulo. V hipokampu jsme nezaznamenali téměř žádnou změnu v počtu CCK⁺ buněk u žádné skupiny (Graf. 1b). V literatuře jsem nenašla měření zabývající se touto strukturou, nicméně interakce opioidního a CCK systému v této struktuře byla prokázána: CCK byl schopen napravit poškození dlouhodobé potenciace vyvolané morfinem (Wen et al., 2014). To však ještě nemusí znamenat změnu hladiny CCK u zvířat vystavených působení morfinu.

Barvení protilátkami proti neuropeptidu Y ukázalo po podání morfinu v některých oblastech nárůst (NAc) a v jiných pokles exprese (hipokampus, amygdala) (Graf 2). Hladina NpY u vysazení naopak nebyla ovlivněna nikde, s výjimkou centrální amygdaly (Graf 2e). Na rozdíl od našeho výsledku nebyla v literatuře zaznamenána změna hladiny této látky v hipokampu při podávání morfinu (Pages et al., 1991). Další zkoumanou oblastí byla amygdala. Při stresu bylo pozorováno snížení hladiny tohoto peptidu v amygdale (Thorsell et al., 1998). Aplikace morfinu byla ve výzkumech popsána jako příčina stresu (Goeldner et al., 2011). Toto by mohlo být možné vysvětlení námi popsaného poklesu hladiny. Jinou zajímavou souvislostí je změna inhibiční transmise v amygdale. V těchto inhibičních buňkách se totiž vyskytuje také NpY. Chronický abúzus grogu zvyšuje GABAergní transmissi v centrální amygdale

⁹ Reinforcement – psychologický vzorec chování např. při závislosti. Znamená posílení behaviorální odpovědi organismu na specifický stimulus (drogu).

(Roberto et al., 2012). Tato adaptace inhibiční neurotransmise může vést ke změnám koncentrace NpY. U abstinující skupiny jsme popsali pokles v této struktuře (Graf. 2e). Důvod by mohl být následující. Neuropeptid Y při vysazení pomáhá potlačovat příznaky abstinenčního syndromu (Woldbye et al., 1998). K těm řadíme anxiety a depresi, které se rozvíjejí u zvířat po vysazení morfinu (Niu et al., 2017; Zan et al., 2015). Amygdala hraje zásadní roli v afektivitě a ve zpracovávání emocí. Snížená hladina NpY tedy může signalizovat nedostatečné potlačování těchto negativních afektivních změn a rozvoj anxiety či deprese. Zjištěný nárůst NpY v nucleus accumbens (Graf 2a) zřejmě souvisí s jeho v literatuře popsanou funkcí. Injekce této látky do NAc totiž vyvolává pocit „odměny“ (Brown et al., 2000). Jeho zvýšení při závislosti na morfinu je tedy logické – neuropeptid Y je zřejmě jednou z molekul, která při administraci drogy vyvolává libé pocity. Při abstinenčním syndromu (8 dní po ukončení podávání morfinu) bylo v literatuře popsáno zvýšení hladiny NpY v hypothalamu (Houshyar et al., 2004), ale jak dokazuje přehled Concalves et al., výsledky různých studií nedošly ke stejnému konsenzu ani pokud se týká pouze této jedné struktury (Gonçalves et al., 2015). Odlišnosti výsledků lze tedy přičítat také rozdílností v designu pokusů.

Výsledky barvení pomocí bromodeoxyuridinu byly na jedné straně zklamáním, na druhé byl výsledek poměrně překvapivý. Struktura, ve které jsme očekávali největší změny v neurogenezi (SGZ), se vůbec nepodařila obarvit. Příčin tohoto nezdaru mohlo být několik. Mohlo dojít k problému s přestupem látky přes HEB. V literatuře lze dohledat, že propustnost bariéry se liší mezi různými druhy laboratorních zvířat (přehled viz Taupin, 2007). Pravděpodobnějším vysvětlením by bylo použití příliš malé dávky. Dávka použitá v naší studii (50 mg/kg) ale odpovídá běžně používané dávce i v ostatních výzkumech (Wang et al., 2011; přehled viz Taupin, 2007). Existují ale i studie používající výrazně větší dávky (300 mg/kg) (Dayer et al., 2003). Mohli bychom brát v úvahu předpoklad, že se značná část protilátky dostala do mozku přes hematoencefalickou bariéru v laterálních komorách. V této situaci by totiž při použití malé dávky byla protilátka vycitána už v laterálních komorách buňkami SVZ a do hipokampu by nedifundovala již téměř žádná. Výsledky ze SVZ jsou naopak zajímavé. V literatuře se uvádí, že SVZ nebývá podáváním návykových látek ani jejich vysazením příliš ovlivněna (Nixon et al., 2004; Eisch et al., 2000). Naše výsledky ukazují pokles počtu nových buněk po podávání morfinu a ještě větší propad neurogeneze po jeho vysazení (Graf 3). Tento pokles dělicích se buněk by mohl být teoreticky zapříčiněn stresem, který souvisí s rozvojem abstinenčních příznaků. Nicméně bylo by překvapivé, kdyby takovouto změnu morfin byl schopen vyvolat v SVZ a nikoliv v SGZ (pokud vycházíme z výsledků ohledně SVZ z literatury). Pravděpodobněji tak mohly hrát roli některé lokálnější faktory, než je stres. Nicméně zcela obecně je třeba podotknout, že výsledky studií na neurogenezi v SGZ jsou značně protichůdné. Studium SVZ zóny se však zabývá pouze minorita studií, je proto možné, že výsledky dalších studií by byly stejně protichůdné jako je tomu u oblasti SGZ.

Dalším způsobem, kterým jsme zjišťovali vliv morfinu na neurogenezi, bylo fluorescenční barvení pomocí protilátek DCX a NeuN. Pozorovali jsme tak ovlivnění maturace neuronů, které může být podle

literatury morfinem narušeno (Arguello et al., 2008). V souladu s tímto poznatkem byl i náš výsledek. Měření odhalilo pokles buněk v obou ovlivněných skupinách, výraznější však při vysazení morfinu (Tab. 4). Tento výsledek je zcela v souladu s barvením bromodeoxyuridinem, kde byl prokázán stejný trend i podobná relativní míra poklesu mezi skupinami (Graf. 3). Při podrobnější analýze jsme se zaměřili na ovlivnění mladšího (2b) a staršího (3) stádia DCX⁺ buněk. Zde jsou naše výsledky s literaturou v souladu jen částečně. U morfinové skupiny byl pokles obou subtypů vyrovnaný, při vysazení došlo k mírně výraznějšímu poklesu starších stádií (Graf 4). V literatuře po chronické expozici morfinu nebyl zaznamenán pokles ranějších stádií vůči kontrole vůbec (Arguello et al., 2008).

Výsledky barvení FJC byly značně nekonzistentní. Ve všech skupinách byly u některých řezů mozků nalezeny v rámci triplikátu oblasti, ve kterých byla patrná neurodegenerace, avšak na jiných řezech toto vidět nebylo. Výsledky bylo tedy obtížné vyhodnotit už v rámci jednoho jedince. Tento jev mohl být způsoben nějakým poškozením mozku během přípravy tkáně (perfúze, odběr mozku, zamražení) nebo během samotného pokusu. Pravděpodobnější je zřejmě poškození během přípravy konkrétního mozku. Pokud by totiž došlo k chybě během barvení, byla by pravděpodobně poškozena celá sada řezů, což jsme nepozorovali. Řezy, které vykazovaly vysoce nekonzistentní výsledek v kontextu daného jedince (v triplikátu), jsme se snažili z analýzy vyloučit. Diskuze dosažených výsledků je tedy velice obtížná, protože zůstává otázkou, do jaké míry jsou data spolehlivá. Přesto se pokusím vyvodit z dosažených výsledků určité závěry. Předně je třeba podotknout, že v dosažených datech byly vidět obrovské odchylky v počtu FJC⁺ buněk. V oblasti NAc byla míra degenerace výrazně zvýšena u obou ovlivněných skupin. Možným mechanismem vysvětlujícím smrt neuronů v těchto skupinách zvířat by mohla být alterace glutamátergního systému. Jak bylo zmíněno v literárním přehledu, vysoká extracelulární hladina glutamátu působí tzv. excitotoxicitu a zapříčiňuje smrt buněk. Chronická aplikace drog vede ke zvýšenému výlevu glutamátu z PFC do NAc a dochází k celkové deregulaci glutamátergního systému (Quintero, 2013). K deregulaci tohoto systému dochází i během vysazení návykových látek (Quintero, 2013). V gyru dentatu byla zaznamenána poměrně vysoká míra degenerace i u kontrolních zvířat. To je zřejmě způsobeno tím, že se jedná o neurogenní část hipokampu. Konstitutivně zde vzniká velké množství nových buněk a zhruba polovina z nich před dokončením maturace degeneruje (Dayer et al., 2003). Také je vhodné poznamenat, že BrdU podané všem skupinám zvířat je toxická látka, která způsobuje smrt buněk (Taupin, 2007). Výrazný počet degenerujících buněk by tak mohl být teoreticky alespoň z části způsoben i tímto vlivem. V basolaterální amygdale zvířat s abstinencí jsme nezaznamenali zvýšení neurodegenerace oproti kontrole. Toto pozorování by mohlo být vysvětleno působením NpY. V literatuře se totiž diskutuje jeho možná neuroprotektivní úloha (Makiura et al., 1999). Naše výsledky tuto hypotézu podporují: u morfinové skupiny, kde bylo prokázáno snížení NpY v BLA, byla prokázána zvýšená neurodegenerace (Grafy 2 d, 5c). U skupiny po vysazení morfinu nebyla hladina NpY výrazně změněna oproti kontrole a neurodegenerace nebyla v BLA zvýšena (Grafy 2d, 5c). Data získaná z centrální amygdaly se zdají být

příkladem nepovedeného výsledku. Stejně velká míra degenerace u morfinových i kontrolních zvířat a naopak nulová u zvířat abstinujících se nezdá být relevantním výsledkem (Graf 5d).

Závěr

Tato práce byla zaměřená na sledování následků, které má dlouhodobé vystavení morfinu na zvířata. Danou problematiku jsem se snažila pojmut komplexně; mapovala jsem vliv morfinu na vznik nových buněk a jejich maturaci, buněčnou smrt neuronů a vybrané neuropeptidové systémy. Tyto aspekty působení morfinu jsem sledovala s použitím několika buněčných markerů a jejich kolokalizací. Výsledky poukázali na to, že morfin ovlivňuje všechny tři zmíněné jevy, avšak v různých oblastech CNS se jeho vliv liší. Konkrétně u cholecystokininu jsme zaznamenali zvýšení v oblasti amygdaly, nezměněna byla hladina v hipokampu a pokles se projevil v nucleus accumbens u obou ovlivněných skupin. Neuropeptid Y byl při chronickém podávání morfinu zvýšen v NAc, snížen v hipokampu a amygdale. Zvířata měla po jeho vysazení hladinu nezměněnu v NAc a hipokampu, pokles byl patrný v amygdale. Proliferace buněk byla negativně ovlivněna morfinem i jeho vysazením, stejně jako maturace neuronálních buněk. Dozrávání jednotlivých stádií neuronů nebylo příliš ovlivněno. Morfin i jeho vysazení v provedeném experimentu vykazovaly schopnost poškozovat buňky. Počet degenerujících neuronů byl zvýšen v NAc a hipokampu u obou skupin vystavených morfinu. V bazolaterální amygdale byl nárůst pozorován jen u chronického podávání morfinu.

Výsledky této práce nastínily, že chronicky podávané relativně nízké dávky morfinu i jeho následné vysazení mají rozsáhlý vliv na celou řadu mozkových struktur a funkcí. Alterace dvou popsaných peptidergických systémů mohou narušovat funkce zprostředkované těmito systémy. V našem případě především potravní chování a afektivitu. Negativní ovlivnění proliferace a zvýšení degenerace může vést kupříkladu k poruše kognitivních funkcí organismu, jako je paměť.

Cíle vytyčené pro tuto práci se podařilo splnit. Prvním krokem bylo zavedení a optimalizace podmínek pro použití protilátek při imunohistochemickém barvení, což se podařilo. Hlavním cílem bylo zmapovat vliv morfinu na výše zmíněné funkce. Tento cíl se podařilo splnit, ačkoliv provedený experiment by bylo vhodné zopakovat s větším množstvím zvířat i odebraných řezů, aby byly získané výsledky konzistentnější a signifikantnější.

Literatura

- Arguello, A. A., Fischer, S. J., Schonborn, J. R., Markus, R. W., Brekken, R. A., & Eisch, A. J. (2009). Effect of chronic morphine on the dentate gyrus neurogenic microenvironment. *Neuroscience*, 159(3), 1003–1010.
- Arguello, A. A., Harburg, G. C., Schonborn, J. R., Mandyam, C. D., Yamaguchi, M., & Eisch, A. J. (2008). Time course of morphine's effects on adult hippocampal subgranular zone reveals preferential inhibition of cells in S phase of the cell cycle and a subpopulation of immature neurons. *Neuroscience*, 157(1), 70–79.
- Atici, S., Cinel, L., & Doruk, N. (2004). OPIOID NEUROTOXICITY : COMPARISON OF MORPHINE AND TRAMADOL IN AN EXPERIMENTAL RAT MODEL. *Intern. J. Neuroscience*, 114(April 2002), 1001–1011.
- Bazov, I., Kononenko, O., Watanabe, H., Kuntic, V., Sarkisyan, D., Taqi, M. M., ... Bakalkin, G. (2011). The endogenous opioid system in human alcoholics : molecular adaptations in brain areas involved in cognitive control of addiction, 161–169.
- Bian, G., Wei, L., Shi, M., Wang, Y., Cao, R., & Chen, L. (2007). Fluoro-Jade C can specifically stain the degenerative neurons in the substantia nigra of the. *Brain Research*, 50(1150), 55–61.
- Bounes, V., Charriton-dadone, B., Levraut, J., Delangue, C., Carpentier, F., Mary-chalon, S., ... Ganetsky, M. (2017). American Journal of Emergency Medicine Predicting morphine related side effects in the ED : An international cohort study ☆. *American Journal of Emergency Medicine*, 35(4), 531–535.
- Breivik, H. (2001). Opioids in cancer and chronic non-cancer pain therapy – indications and controversies. *Acta Anesthesiol Scand*, 1996(3), 1059–1066.
- Brown, C. M., Coscina, D. V., & Fletcher, P. J. (2000). The rewarding properties of neuropeptide Y in perifornical hypothalamus vs . nucleus accumbens. *Peptides*, 21, 1279–1287.
- Brownstein, J. S., Green, T. C., Sc, M., Cassidy, T. A., & Butler, S. F. (2010). Geographic Informations Systems and Pharmacoepidemiology: Using spatial cluster detection to

- monitor local patterns of prescription opioid abuse. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, 19(6), 627–637.
- Cassano, P., & Argibay, P. (2010). DEPRESION Y NEUROPLASTICIDAD . INTERACCION DE LOS SISTEMAS NERVIOSO, ENDOCRINO E INMUNE. *Medicina*, 70, 185–193.
- Cooper, S., Robison, A. J., & Mazei-robison, M. S. (2017). Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics*, 14, 687–697.
- Cunha-oliveira, T., Rego, A. C., & Oliveira, C. R. (2008). Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain Research Reviews*, 58, 192–208.
- Dayer, A. G., Ford, A. A., Cleaver, K. M., Yassaee, M., & Cameron, H. A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 460(4), 563–572.
- De Gregori, S., De Gregori, M., Ranzani, G. N., Allegri, M., Minella, C., & Regazzi, M. (2012). Morphine metabolism, transport and Brain disposition. *Metabolic Brain Disease*, 27(1), 1–5.
- De La Rosa-Prieto, C., De Moya-Pinilla, M., Saiz-Sanchez, D., Ubeda-Banon, I., Arzate, D. M., Flores-Cuadrado, A., ... Martinez-Marcos, A. (2015). Olfactory and cortical projections to bulbar and hippocampal adult-born neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(4), 1–2.
- De La Rosa-Prieto, C., Saiz-Sanchez, D., Ubeda-Bañon, I., Argandoña-Palacios, L., Garcia-Muñozguren, S., & Martinez-Marcos, a. (2010). Neurogenesis in subclasses of vomeronasal sensory neurons in adult mice. *Developmental Neurobiology*, 70(14), 961–970.
- Dossin, O., & Hanoun, N. (1996). Involvement of locus coeruleus projections in opiate withdrawal but not in opiate tolerance in mice. *European Journal of Pharmacology*, 308, 271–274.
- Drake, C. T., & Milner, T. A. (2002). Mu opioid receptors are in discrete hippocampal interneuron subpopulations. *Hippocampus*, 12(2), 119–136.
- Eisch, A. J., Barrot, M., Schad, C. A., Self, D. W., & Nestler, E. J. (2000). Opiates inhibit

- neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7579–84.
- Eisch, A. J., & Harburg, G. C. (2006). Opiates, psychostimulants, and adult hippocampal neurogenesis: Insights for addiction and stem cell biology. *Hippocampus*, 16(3), 271–286.
- Ellison, G. (2002). Neural degeneration following chronic stimulant abuse reveals a weak link in brain , fasciculus retroflexus , implying the loss of forebrain control circuitry. *European Neuropsychopharmacology*, 12, 287–297.
- Esmaeili, M., Kermani, M., Parvishan, A., & Haghparast, A. (2012). Role of D1 / D2 dopamine receptors in the CA1 region of the rat hippocampus in the rewarding effects of morphine administered into the ventral tegmental area. *Behavioural Brain Research*, 231(1), 111–115.
- Fiorelli, R., Azim, K., Fischer, B., & Raineteau, O. (2015). Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis. *Development*, 142, 2109–2120.
- Fishbein, D. H., Krupitsky, E., Flannery, B. A., Langevin, D. J., Bobashev, G., Verbitskaya, E., ... Tsoy, M. (2007). Neurocognitive characterizations of Russian heroin addicts without a significant history of other drug use. *Drug and Alcohol Dependence*, 90, 25–38.
- Fischer, S. J., Arguello, A. A., Charlton, J. J., Fuller, D. C., Zachariou, V., & Eisch, A. J. (2008). Morphine blood levels, dependence, and regulation of hippocampal subgranular zone proliferation rely on administration paradigm. *Neuroscience*, 151(4), 1217–1224.
- Gabriel C Quintero. (2013). Role of nucleus accumbens glutamatergic plasticity in drug addiction. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 9, 1499–1512.
- Garland, E. L., & Ph, D. (2012). Pain Processing in the Human Nervous System: A Selective Review of Nociceptive and Biobehavioral Pathways. *Prim Care*, 39(3), 561–571.
- Gobin, S. J. P., Montagne, L., Van Zutphen, M., Van Valk, P. Der, Van Den Elsen, P. J., & De Groot, C. J. A. (2001). Opioid system diversity in developing neurons, astroglia, and oligodendroglia in the subventricular zone and striatum: Impact on gliogenesis in vivo. *Glia*, 36(1), 78–88.
- Goeldner, C., Lutz, P., Darcq, E., Halter, T., Clesse, D., Ouagazzal, A., & Kieffer, B. L.

- (2011). Impaired Emotional-Like Behavior and Serotonergic Function During Protracted Abstinence from Chronic Morphine. *Biological Psychiatry*, 69(3), 236–244.
- Gonçalves, J., Martins, J., Baptista, S., Ambrósio, A. F., & Silva, A. P. (2015). Effects of drugs of abuse on the central neuropeptide Y system. *Addiction Biology*, 21, 755–765.
- Han, H., Dong, Z., Jia, Y., Mao, R., Zhou, Q., & Yang, Y. (2015). Opioid addiction and withdrawal differentially drive long-term depression of inhibitory synaptic transmission in the hippocampus. *Scientific Reports*, 5, 1–6.
- Harburg, G. C., Hall, F. S., Harrist, A. V, Sora, I., Uhl, G. R., & Eisch, A. J. (2007). KNOCKOUT OF THE MU OPIOID RECEPTOR ENHANCES THE SURVIVAL OF ADULT-GENERATED HIPPOCAMPAL GRANULE CELL NEURONS. *Neuroscience*, 144, 77–87.
- Hauser, K., Kyung Hahn, Y., & Adjan, V. (2009). HIV-1 Tat and Morphine Have Interactive Effects on Oligodendrocyte Survival and Morphology. *Glia*, 57(2), 194–206.
- Hemstapat, K., Smith, S. A., Monteith, G. R., & Smith, M. T. (2003). The Neuroexcitatory Morphine Metabolite , Morphine- 3-glucuronide (M3G), is not Neurotoxic in Primary Cultures of either Hippocampal or Cerebellar Granule Neurones. *Short Communication*, 93, 197–200.
- Holzer, P., Reichmann, F., & Farzi, A. (2012). Neuropeptides Neuropeptide Y , peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut – brain axis. *Neuropeptides*, 46(6), 261–274.
- Houshyar, H., Manalo, S., & Dallman, M. F. (2004). Time-Dependent Alterations in mRNA Expression of Brain Neuropeptides Regulating Energy Balance and Hypothalamo – Pituitary – Adrenal Activity after Withdrawal from Intermittent Morphine Treatment. *Journal of Neuroscience*, 24(42), 9414–9424.
- Isokawa, M. (2012). Cellular Signal Mechanisms of Reward-Related Plasticity in the Hippocampus, 2012.
- Jiang, J. X., Liu, H., Huang, Z. Z., Cui, Y., Zhang, X. Q., Zhang, X. L., ... Xin, W. J. (2016). The role of CA3-LS-VTA loop in the formation of conditioned place preference induced by context-associated reward memory for morphine. *Addiction Biology*, 1–14.
- Kahn, L., Alonso, G., Normand, E., & Manzoni, O. J. (2005). Repeated morphine treatment alters polysialylated neural cell adhesion molecule, glutamate decarboxylase-67

- expression and cell proliferation in the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 21(2), 493–500.
- Kim, J. A., & Siegel, S. (2001). The role of cholecystokinin in conditional compensatory responding and morphine tolerance in rats. *Behav Neurosci*, 115(3), 704–709.
- Kiyatkin, E., & Sharma, S. (2013). ENVIRONMENTAL CONDITIONS MODULATE NEUROTOXIC EFFECTS OF PSYCHOMOTOR STIMULANT DRUGS OF ABUSE Eugene. *Int. Rev. Neurobiol.*, 102(443), 147–171.
- Knoth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R. P., ... Kempermann, G. (2010). Murine Features of Neurogenesis in the Human Hippocampus across the Lifespan from 0 to 100 Years. *PLoS ONE*, 5(1), 1–11.
- Kolodziej, A., Stumm, R., Becker, A., & Ho, V. (2008). Endogenous opioids inhibit ischemia-induced generation of immature hippocampal neurons via the μ -opioid receptor. *European Journal of Neuroscience*, 27(2007), 1311–1319.
- Lipp, J. (1991). possible mechanisms of morphine analgesia. *Clinical Neuropharmacology*, 14(2), 131–147.
- Litmala, O. (2016). Cytotoxicity of Oxycodone and Morphine in Human Neuroblastoma and Mouse Motoneuronal Cells : A Comparative Approach. *Drugs*, 16, 155–163.
- Liu, X., Wang, G., Pu, H., & Jing, H. (2014). Abnormal intracellular calcium homeostasis associated with vulnerability in the nerve cells from heroin-dependent rat. *Brain Research*, 1572, 40–49.
- Lucas, L. R., Angulo, J. A., Moal, M. Le, McEwen, B. S., & Piazza, P. V. (1998). Neurochemical characterization of individual vulnerability to addictive drugs in rats. *European Journal of Neuroscience*, 10, 3153–3163.
- Makiura, Y., Suzuki, F., Chevalier, E., & Onte, B. (1999). Excitatory Granule Cells of the Dentate Gyrus Exhibit a Double Inhibitory Neurochemical Content after Intrahippocampal Administration of Kainate in Adult Mice. *Experimental Neurology*, 159, 73–83.
- Mao, J., Sung, B., Ji, R., & Lim, G. (2002). Neuronal Apoptosis Associated with Morphine Tolerance : Evidence for an Opioid-Induced Neurotoxic Mechanism. *Journal of Neuroscience*, 22(17), 7650–7661.

- Maric, T., Cantor, A., Cuccioletta, H., Tobin, S., & Shalev, U. (2009). Neuropeptide Y augments cocaine self-administration and cocaine-induced hyperlocomotion in rats. *Peptides*, 30, 721–726.
- Massa, H., Lacoh, C., & Vutskits, L. (2012). Effects of Morphine on the Differentiation and Survival of Developing Pyramidal Neurons During the Brain Growth Spurt. *Toxicological Sciences*, 130(1), 168–179.
- Meneghini, V., Cuccurazzu, B., Bortolotto, V., Ramazzotti, V., Ubezio, F., Tzschentke, T. M., ... Grilli, M. (2014). The Noradrenergic Component in Tapentadol Action Counteracts m-Opioid Receptor – Mediated Adverse Effects on Adult Neurogenesis. *Molecular Pharmacology*, 85, 658–670.
- Minami, M., & Satoh, M. (1995). Molecular Biology of the Opioid Receptors: structures, functions, distributions. *Neuroscience Research*. 23(191-195).
- Motaghinejad, M., Karimian, M., Motaghinejad, O., & Shabab, B. (2015). Pharmacological Reports Protective effects of various dosage of Curcumin against morphine induced apoptosis and oxidative stress in rat isolated hippocampus. *Pharmacological Reports*, 67(2), 230–235.
- Motaghinejad, M., Karimian, S. M., Motaghinejad, O., Shabab, B., Asadighaleni, M., & Fatima, S. (2015). The effect of various morphine weaning regimens on the sequelae of opioid tolerance involving physical dependency, anxiety and hippocampus cell neurodegeneration in rats. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 29(3), 299–309.
- Naderi-heiden, A., Frey, R., Presslich, O., Frottier, P., Willinger, U., Blasbichler, T., ... Kasper, S. (2005). Effect of intravenous magnesium sulphate in reducing irritability and restlessness in pure and polysubstance opiate detoxification. *Psychiatry Research*, 135, 53–63.
- Niu, H., Zhang, G., Li, H., Zhang, Q., Li, T., Ding, S., ... Hu, M. (2017). Neuroscience Letters Multi-system state shifts and cognitive deficits induced by chronic morphine during abstinence. *Neuroscience Letters*, 640, 144–151.
- Nixon, K., & Crews, F. T. (2004). Temporally Specific Burst in Cell Proliferation Increases Hippocampal Neurogenesis in Protracted Abstinence from Alcohol. *Journal of Neuroscience*, 24(43), 9714–9722.

- Noble, F., Benturquia, N., Crete, D., Canestrelli, C., Nieto, M. M., Wilson, J., & Roques, B. P. (2011). Relationship between vulnerability to reinforcing effects of morphine and activity of the endogenous cholecystokinin system in Lewis and Fischer rats. *Addiction Biology*, 17, 528–538.
- Nummenmaa, C. L., Pet, T., & Box, P. O. (2017). Opioid system and human emotions. *British Journal of Pharmacology*, 1–13.
- Obrocki, J., Schmoldt, A., Buchert, R., Andresen, B., & Petersen, K. (2002). Specific neurotoxicity of chronic use of ecstasy. *Toxicology Letter*, 127, 285–297.
- Pages, N., Orosco, M. (1991). The effects of chronic administration of morphine on the levels of brain and adrenal catecholamines and neuropeptide Y in rats. *Gen Pharmacol.* 22, 943-947.
- Patel, K. T., Stevens, M. C., Meda, S. A., Muska, C., Thomas, A. D., Potenza, M. N., & Pearlson, G. D. (2013). Robust Changes in Reward Circuitry During Reward Performance of a Monetary Incentive Delay Task. *Biological Psychiatry*, 74(7), 529–537.
- Pittenger, C., & Duman, R. S. (2008). Stress , Depression , and Neuroplasticity : A Convergence of Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33, 88–109.
- Recinto, P., Samant, A. R. H., Chavez, G., Kim, A., Yuan, C. J., Soleiman, M., ... Mandyam, C. D. (2011). Levels of Neural Progenitors in the Hippocampus Predict Memory Impairment and Relapse to Drug Seeking as a Function of Excessive Methamphetamine Self-Administration. *Neuropsychopharmacology*, 37(5), 1275–1287.
- Roberto, M., Gilpin, N. W., & Siggins, G. R. (2012). The Central Amygdala and Alcohol: Role of γ -Aminobutyric Acid, Glutamate, and Neuropeptides. *Perspect Med*, 2, 1–14.
- Sargeant, T. J., Miller, J. H., & Day, D. J. (2008). Opioidergic regulation of astroglial/neuronal proliferation: Where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 107(4), 883–897.
- Saxena, S., & Caroni, P. (2011). Review Selective Neuronal Vulnerability in Neurodegenerative Diseases : from Stressor Thresholds to Degeneration. *Neuron*, 71(1), 35–48.
- Shi, W., Ma, C., Qi, Q., Liu, L., Bi, H., Cong, B., & Li, Y. (2015). The effect of different

- durations of morphine exposure on mesencephalic dopaminergic neurons in morphine dependent rats. *NeuroToxicology*, 51, 51–57.
- Skrabalova, J., Drastichova, Z., & Novotny, J. (2013). Morphine as a Potential Oxidative Stress-Causing Agent. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 10, 367–372.
- Sverrisdóttir, E., Meldgaard, T., Estrup, A., Mohr, A., Louring, L., & Kreilgaard, M. (2015). A review of morphine and morphine-6-glucuronide ' s pharmacokinetic – pharmacodynamic relationships in experimental and clinical pain. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74, 45–62.
- Tao, S., B. (1995). INVOLVEMENT OF THE DORSAL RAPHE BUT NOT MEDIAN RAPHE NUCLEUS IN MORPHINE-INDUCED INCREASES IN SEROTONIN RELEASE IN THE RAT FOREBRAIN. *Neuroscience*, 68(2), 553–561.
- Tatarkova, Z., Kovalska, M., Timkova, V., Racay, P., Lehotsky, J., & Kaplan, P. (2016). The Effect of Aging on Mitochondrial Complex I and the Extent of Oxidative Stress in the Rat Brain Cortex. *Neurochemical Research*, 41(8), 2160–2172.
- Taupin, P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews*, 53(1), 198–214.
- Thorsell, A., Svensson, P., Wiklund, L., Sommer, W., Ekman, R., & Heilig, M. (1998). Suppressed neuropeptide Y (NPY) mRNA in rat amygdala following restraint stress. *Regulatory Peptide*, 76, 247–254.
- Wang, C., Zhang, M., Sun, C., Cai, Y., You, Y., Huang, L., & Liu, F. (2011). Sustained increase in adult neurogenesis in the rat hippocampal dentate gyrus after transient brain ischemia. *Neuroscience Letters*, 488(1), 70–75.
- Weber, M. L., Farooqui, M., Nguyen, J., Ansonoff, M., John, E., Hebbel, R. P., ... Pintar, J. E. (2009). Morphine induces mesangial cell proliferation and glomerulopathy via μ -opioid receptors. *Am J Renal Physiol*, 55455, 1388–1397.
- Wen, D., Ma, C.-L., Zhang, Y.-J., Meng, Y.-X., Ni, Z.-Y., Li, S.-J., & Cong, B. (2012). Cholecystokinin receptor-1 mediates the inhibitory effects of exogenous cholecystokinin octapeptide on cellular morphine dependence. *BMC Neuroscience*, 13(1), 63.
- Wen, D., Zang, G., Sun, D., Yang, S., Yu, F., Li, S., ... Cong, B. (2013). EFFECTS OF CCK-8 ON THE REINSTATEMENT OF MORPHINE-INDUCED CPP AND EXPRESSION

OF BEHAVIORAL SENSITIZATION IN RATS, 238, 230–241.

- Wen, D., Zang, G., Sun, D., Yu, F., Mei, D., Ma, C., & Cong, B. (2014). Cholecystokinin-octapeptide restored morphine-induced hippocampal long-term potentiation impairment in rats. *Neuroscience Letters*, 559, 76–81.
- Wen, Ma, C.-L., Zhang, Y.-J., Meng, Y.-X., Ni, Z.-Y., Li, S.-J., & Cong, B. (2012). Cholecystokinin receptor-1 mediates the inhibitory effects of exogenous cholecystokinin octapeptide on cellular morphine dependence. *BMC Neuroscience*, 13(1), 63.
- Wen, Sun, D., Zang, G., Hao, L., Liu, X., Yu, F., & Cong, B. (2014). CHOLECYSTOKININ OCTAPEPTIDE INDUCES ENDOGENOUS OPIOID-DEPENDENT ANXIOLYTIC EFFECTS IN MORPHINE-WITHDRAWAL RATS. *Neuroscience*, 277, 14–25.
- Wilkinson, D. S., Turner, J. R., Blendy, J. A., & Gould, T. J. (2013). Genetic background influences the effects of withdrawal from chronic nicotine on learning and high-affinity nicotinic acetylcholine receptor binding in the dorsal and ventral hippocampus, 201–208.
- Willner, D., Cohen-yeshurun, A., Avidan, A., Ozersky, V., Shohami, E., & Leker, R. R. (2014). Short Term Morphine Exposure In Vitro Alters Proliferation and Differentiation of Neural Progenitor Cells and Promotes Apoptosis via Mu Receptors. *PLoS ONE*, 9(7), 1–12.
- Woldbye, D. P. D., Klemp, K., & Madsen, T. M. (1998). Neuropeptide Y Attenuates Naloxone-Precipitated Morphine Withdrawal via Y5-like Receptors 1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284(2), 633–636.
- Xiao, H., Zhai, D., Yan, B., Wang, J., Xu, W., Wang, G., ... Li, H. (2009). A role for the parafascicular thalamic nucleus in the development of morphine dependence and withdrawal. *Brain Research*, 1271, 74–82.
- Xiong, W., & Yu, L. (2006). Involvement of endogenous cholecystokinin in tolerance to morphine antinociception in the nucleus accumbens of rats, 173, 116–121.
- Xu, C., Zhang, Y., Zheng, H., & Loh, H. (2014). Morphine Modulates Mouse Hippocampal Progenitor Cell Lineages by Upregulating miR-181a Level. *Stem Cells*, 32, 2961–2972.
- Xu, C., Zheng, H., & Loh, H. H. . (2015). Morphine Promotes Astrocyte-Preferential Differentiation of Mouse Hippocampal Progenitor Cells via PKC ϵ -Dependent ERK Activation. *Stem Cells*, 1, 2762–2772.

- Yang, S., Wen, D., Dong, M., Li, D., Sun, D., Ma, C., & Cong, B. (2013). Effects of cholecystokinin-8 on morphine-induced spatial reference memory impairment in mice. *Behavioural Brain Research*, 256, 346–353.
- Yuan, C. J., Marie, J., Quirocho, D., Kim, A., Wee, S., & Mandyam, C. D. (2011). Pharmacology , Biochemistry and Behavior Extended access methamphetamine decreases immature neurons in the hippocampus which results from loss and altered development of neural progenitors without altered dynamics of the S-phase of the cell cycle. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 100(1), 98–108.
- Zadina, J. E., Nilges, M. R., Morgenweck, J., Zhang, X., Hackler, L., & Fasold, M. B. (2016). Neuropharmacology Endomorphin analog analgesics with reduced abuse liability , respiratory depression , motor impairment , tolerance , and glial activation relative to morphine. *Neuropharmacology*, 105, 215–227.
- Zan, G., Wang, Q., Wang, Y., Liu, Y., Hang, A., Shu, X., & Liu, J. (2015). Antagonism of μ opioid receptor in the nucleus accumbens prevents the depressive-like behaviors following prolonged morphine abstinence. *Behavioural Brain Research*, 291, 334–341.
- Zhai, T., Shao, Y., Xie, C., Ye, E., Zou, F., Li, S., & Yang, Z. (2014). Altered intrinsic hippocampus declarative memory network and its association with impulsivity in abstinent heroin dependent subjects. *Behavioural Brain Research*, 272(27), 209–217.
- Zhang, Y., Xu, C., Zheng, H., Loh, H. H., & Law, P. Y. (2016). Morphine modulates adult neurogenesis and contextual memory by impeding the maturation of neural progenitors. *PLoS ONE*, 11(4), 1–19.
- Zheng, H., Zhang, Y., Li, W., Loh, H. H., & Law, P. (2013). NeuroD Modulates Opioid Agonist-Selective Regulation of Adult Neurogenesis and Contextual Memory Extinction. *Neuropsychopharmacology*, 38(5), 770–777.
- Zhou, Y., & Sun, Y. (1993). Increased release of immunoreactive cholecystokinin octapeptide by morphine and potentiation of μ / κ -opioid analgesia by CCK B receptor antagonist L-365 , 260 in rat spinal cord. *European Journal of Pharmacology*, 234, 147–154.